

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Jens Werner

**Der Einfluss von 12/15-Lipoxygenase-Hemmung und Tacrolimus-Behandlung
auf die Glutathionperoxidase-4-abhängige Signalkaskade im hepatischen
Ischämie-Reperfusionsschaden**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Moritz Drefs

aus

Gifhorn

2019



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Rentsch

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Fritz Krombach

Prof. Dr. med. Max Schnurr

Prof. Dr. med. Reinhart Zachoval

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Michael N. Thomas

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 19. 12. 2019

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
VERÖFFENTLICHUNG	8
1. EINLEITUNG.....	9
1.1 LEBERTRANSPLANTATION IN DEUTSCHLAND - EIN AKTUELLER ÜBERBLICK	9
1.1.1 Stellenwert und Indikationen zur Lebertransplantation	9
1.1.2 Quantitative und qualitative Einschränkungen der Organselektion in Deutschland	10
1.1.3 Komplikationen und Prognose	11
1.2 HEPATISCHER ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN.....	12
1.2.1 Grundlagen des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens	12
1.2.2 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies	14
1.2.3 Involvierte Mediatormechanismen	15
1.2.4 Involvierte Formen des Zelltods	17
1.2.4.1 Nekrose	17
1.2.4.2 Apoptose	17
1.2.4.3 Nekrapoptose.....	18
1.2.4.4 Ferroptose	20
1.3 GLUTATHION-PEROXIDASE-4-ABHÄNGIGE SIGNALKASKADE	20
1.3.1 Arachidonsäure-Metabolismus	21
1.3.2 Die Enzymgruppe der Lipoxygenasen.....	21
1.3.3 12/15-Lipoxygenase als Initiator des Zelltods nach oxidativem Stress	22
1.3.4 Die Rolle des Glutathions und der Glutathionperoxidase-4.....	23
1.3.5 Relevanz in extrahepatischen Organsystemen	25
1.3.6 Baicalein.....	26
1.4 TACROLIMUS	27
1.4.1 Entwicklung und Indikation	27
1.4.2 Wirkmechanismus	28
1.4.3 Hepatoprotektive Effekte	28
2. FRAGESTELLUNG	30
3. MATERIAL UND METHODEN.....	32
3.1 VERSUCHSTIERE	32
3.2 MODELL.....	32

3.2.1	Verwendete Reagenzien und Operationsinstrumentarium	32
3.2.1.1	DMSO (Dimethylsulfoxid)	34
3.2.2	Anästhesie	35
3.2.3	Operationsablauf	37
3.2.3.1	Induktion von Ischämie und Reperfusion	37
3.2.3.2	Scheinoperation	40
3.2.4	Probenasservierung	40
3.3	ANALYSEVERFAHREN	41
3.3.1	Makrohämodynamik	41
3.3.2	TUNEL-Assay	42
3.3.3	Gewebelyse, Proteinmengenbestimmung und Western-Blot-Untersuchungen	45
3.3.4	Laborchemische Serumanalysen	49
3.3.5	Glutathion-Messung	51
3.3.5.1	Bestimmung der Gesamt-Glutathionkonzentration	51
3.3.5.2	Bestimmung der GSSG-Konzentration	52
3.3.5.3	Bestimmung der GSH-Konzentration	53
3.4	AUSWERTUNGSVERFAHREN	53
3.4.1	Statistische Methoden	53
3.4.2	Optische Flächenfraktionsanalyse	54
3.4.3	Optische Dichtemessung	56
3.4.4	Spektralphotometrie	57
3.5	VERSUCHSGRUPPEN UND –PROTOKOLLE	58
3.5.1	Hepatischer Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI)	58
3.5.2	IRI mit Baicalein- Vorbehandlung	58
3.5.3	IRI mit DMSO-Vorbehandlung	59
3.5.4	IRI mit Tacrolimus-Vorbehandlung	59
3.5.5	IRI mit Tacrolimus- & Baicalein-Vorbehandlung	59
4.	ERGEBNISSE	61
4.1	EFFEKTE DES HEPATISCHEN ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADENS	61
4.1.1	Kreislaufparameter	61
4.1.2	Zelltod	62
4.1.3	Proapoptotische Enzyme	64
4.1.3.1	ERK1/2	64
4.1.3.2	SAPK/JNK	65
4.1.3.3	Caspase-3	65
4.1.3.4	PARP	66

4.1.4	Alteration der Serum-Leberwertkonzentrationen	67
4.1.5	Substratverbrauch von Gpx4	68
4.2	EFFEKTE DER BAICALEIN-VORBEHANDLUNG	70
4.2.1	Kreislaufparameter	70
4.2.2	Zelltod	71
4.2.3	Proapoptotische Enzyme	73
4.2.3.1	ERK1/2	73
4.2.3.2	SAPK/JNK	74
4.2.3.3	Caspase-3	75
4.2.3.4	PARP	77
4.2.4	Alteration der Serum-Leberwertkonzentrationen	78
4.2.5	Substratverbrauch von Gpx4	82
4.3	EFFEKTE DER DMSO-VORBEHANDLUNG	83
4.3.1	Kreislaufparameter	83
4.3.2	Zelltod	85
4.3.3	Proapoptotische Enzyme	86
4.3.3.1	ERK1/2	86
4.3.3.2	SAPK/JNK	88
4.3.3.3	Caspase-3	89
4.3.3.4	PARP	90
4.3.4	Alteration der Serum-Leberwertkonzentrationen	92
4.3.5	Substratverbrauch von Gpx4	94
4.4	EFFEKTE DER TACROLIMUS-VORBEHANDLUNG	96
4.4.1	Kreislaufparameter	96
4.4.2	Zelltod	97
4.4.3	Proapoptotische Enzyme	98
4.4.3.1	ERK1/2	98
4.4.3.2	SAPK/JNK	100
4.4.3.3	Caspase-3	101
4.4.3.4	PARP	102
4.4.4	Alteration der Serum-Leberwertkonzentrationen	104
4.4.5	Substratverbrauch von Gpx4	107
4.5	EFFEKTE DER KOMBINIERTEN TACROLIMUS- & BAICALEINVORBEHANDLUNG	108
4.5.1	Kreislaufparameter	108
4.5.2	Zelltod	110
4.5.3	Proapoptotische Enzyme	111
4.5.3.1	ERK1/2	111

4.5.3.2	SAPK/JNK	113
4.5.3.3	Caspase-3	114
4.5.3.4	PARP	115
4.5.4	Alteration der Serum-Leberwertkonzentrationen	117
4.5.5	Substratverbrauch von Gpx4	120
4.6	VERGLEICHENDE ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE NACH INDUKTION DES HEPATISCHEN	
	ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN.....	122
4.6.1	Kreislaufparameter	122
4.6.2	Zelltod	123
4.6.3	Proapoptotische Enzyme	124
4.6.3.1	ERK1/2	124
4.6.3.2	SAPK/JNK	125
4.6.3.3	Caspase-3	126
4.6.3.4	PARP	127
4.6.4	Alteration der Serum-Leberwertkonzentrationen	128
4.6.5	Substratverbrauch von Gpx4	130
5.	DISKUSSION	132
5.1	DISKUSSION DER FRAGESTELLUNG	132
5.2	DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN	133
5.2.1	Diskussion des Modells.....	133
5.2.2	Diskussion der Analyseverfahren	136
5.2.3	Diskussion der Auswertungsverfahren.....	138
5.3	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	139
5.3.1	Kreislaufstabilität und –unterschiede der Versuchsgruppen	139
5.3.2	Inhibition von 12/15-Lipoxygenase verhindert Zelltod nach hepatischem IRI.....	141
5.3.3	Relevante Rolle der Gpx4-abhängigen Signalkaskade nach hepatischem IRI	142
5.3.4	Relevante zelltodvermittelnde Mediatoren in Gpx4-abhängiger Signalkaskade	144
5.3.5	Hepatoprotektivität von DMSO	146
5.3.6	Toxizität von DMSO und Baicalein.....	148
5.3.7	Hepatoprotektivität und Toxizität von Tacrolimus.....	150
5.3.8	Fehlende Steigerung eines Therapieeffekts durch die Kombinationstherapie aus Baicalein und Tacrolimus.....	154
5.4	WERTUNG UND AUSBLICK	157
6.	ZUSAMMENFASSUNG	161

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	164
8. QUELLENVERZEICHNIS.....	168
9. DANKSAGUNG.....	195
10. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	197

Veröffentlichung

Teilergebnisse des hier beschriebenen Forschungsprojekts wurden bereits in dem internationalen Fachmagazin *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* im Jahre 2017 in folgendem Artikel unter Erstautorschaft in englischer Sprache veröffentlicht:

Moritz Drefs, Michael N. Thomas, Markus Guba, Martin K. Angele, Jens Werner, Marcus Conrad, Christian J. Steib, Lesca M. Holdt, Joachim Andrassy, Andrej Khandoga und Markus Rentsch. „Modulation of Glutathione Hemostasis by Inhibition of 12/15-Lipoxygenase Prevents ROS-Mediated Cell Death after Hepatic Ischemia and Reperfusion“. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2017, Article ID 8325754, 12 Seiten, 2017.

1. Einleitung

1.1 Lebertransplantation in Deutschland - ein aktueller Überblick

1.1.1 Stellenwert und Indikationen zur Lebertransplantation

Die Lebertransplantation nimmt eine zentrale Rolle in der Viszeralchirurgie in Deutschland ein, da sie für eine mannigfaltige Anzahl an Lebererkrankungen, insbesondere bei hochgradig eingeschränkter Leberfunktion, die einzig kurativ-therapeutische Option darstellt (1, 2). Bei 760 Lebertransplantationen, die in Deutschland im Jahre 2017 mit postmortalen Spenderorganen durchgeführt wurden, entspricht das zwar einem Anteil von lediglich 0,03% der durchgeführten viszeralchirurgischen Operationen (3, 4). Aufgrund der therapeutischen Alternativlosigkeit bei terminal verlaufenden Lebererkrankungen bei fehlendem, adäquatem Organersatzverfahren ist die Lebertransplantation dennoch von erhöhter wissenschaftlicher, medizinischer und sozioökonomischer Relevanz (1, 5).

Ca. 50-60% aller Lebertransplantationen in Deutschland werden aufgrund einer terminalen Leberzirrhose und -fibrose durchgeführt (2, 6). Hierbei stellte die alkoholische Leberkrankheit im Jahr 2017 die größte Gruppe für eine Neuanmeldung zur Lebertransplantation dar, während sämtliche andere Ätiologien der Leberzirrhose kumuliert eine minimal kleinere Kohorte bilden (3) (Abb. 1). Als dritthäufigste Indikation folgt dann die Gruppe der malignen, lebereigenen Tumore, allen voran das hepatozelluläre Karzinom (6).

2017 DEUTSCHLAND		
Indikationen für eine Lebertransplantation		
DIE HÄUFIGSTEN ICD-10 HAUPTDIAGNOSEN (BEI NEUANMELDUNG) n=1.213		
K70	Alkoholische Leberkrankheit	288
K74	Fibrose und Zirrhose der Leber	274
C22	Bösartige Neubildung der Leber und der intrahepatischen Gallengänge	204
K72	Leberversagen, anderenorts nicht klassifiziert	125
K83	Sonstige Krankheiten der Gallenwege	125
Q44	Angeborene Fehlbildungen der Gallenblase, der Gallengänge u. der Leber	96
K76	Sonstige Krankheiten der Leber	28
E88	Sonstige Stoffwechselstörungen	25
E83	Störungen des Mineralstoffwechsels	11
E74	Sonstige Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels	9
		1.185
Bei einem Patienten sind mehrere Diagnosen möglich. Insgesamt: 19 Hauptdiagnosen bei 1.213 Fällen		
Quelle: Eurotransplant		DSO 98

Abb. 1: Tabellarische Übersicht über die häufigsten Hauptdiagnosen für eine Anmeldung zur Lebertransplantation in absteigender Reihenfolge. Aus DSO, 2018 (3).

1.1.2 Quantitative und qualitative Einschränkungen der Organselektion in Deutschland

Jedoch nimmt die Anzahl der in Deutschland durchgeführten Lebertransplantationen in den vergangenen Jahren stetig ab, was zu einer Verschärfung des bereits bestehenden Missverhältnis aus zur Verfügung stehenden Transplantaten und auf der Organwarteliste befindlichen Empfängern führt (7). Wenngleich eine aktuelle Umfrage der Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung ergab, dass 84% der Befragten einer Organspende eher positiv gegenüber eingestellt sind, sprechen die von Eurotransplant erhobenen Daten eine andere Sprache (8). So war im vergangenen Jahrzehnt ein deutlicher Rückgang in der Zahl der transplantierten Lebern, wie auch der Spender allgemein, zu verzeichnen (3, 9) (Abb. 2).

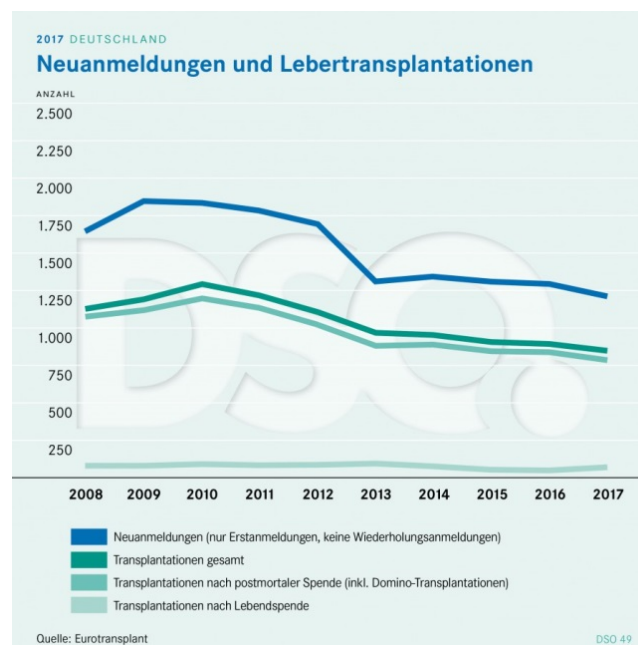


Abb. 2: Graphische Darstellung der Anzahl der Erstanmeldungen für eine Lebertransplantation (blau), sowie der durchgeführten Lebertransplantationen (dunkelgrün; nach postmortaler Spende mittelgrün, nach Lebendspende hellgrün) im Laufe der Jahre in Deutschland. Aus DSO, 2018 (3).

Allerdings schränkt nicht nur die absolute Organknappheit allein die Prognose von Patienten, die sich auf der Warteliste für die Lebertransplantation befinden, zunehmend ein. Durch den Mangel an Spenderorganen und der damit verbundenen längeren Wartezeit auf ein Organ steigt auch das relative Alter der Patienten auf der Warteliste und damit verbunden die Prävalenz an Komorbiditäten (5). In dem Zeitraum von 2002 bis 2016 ist das mediane Patientenalter auf der Warteliste zur Lebertransplantation um nahezu vier Jahre gestiegen (9). Zudem führt der allgemeine Organmangel dazu, dass im Laufe der Zeit zunehmend ältere Spenderorgane zur Organtransplantation akzeptiert werden. Lag das mediane Organspen-

deralter im Jahre 1996 noch bei 35, so lag es 20 Jahre später im Jahr 2016 bereits bei 55 (9) (Abb. 3). Auch unabhängig vom reinen Alter konnte in diesem Zeitraum festgestellt werden, dass aufgrund des Organmangels zunehmend Organe von Spendern mit einer höheren Anzahl an Komorbiditäten zur Transplantation angeboten und akzeptiert wurden (5, 6). Die gerade in Deutschland spürbaren Entwicklungen der eingeschränkten quantitativen und qualitativen Organselektion für eine Lebertransplantation ermutigen zur Erforschung weiterer Möglichkeiten, die vorhandenen Spenderorgane noch besser zu schützen und schädliche Einflüsse auf die Transplantate zu minimieren, um somit längeres Organ- und Empfängerüberleben zu ermöglichen.

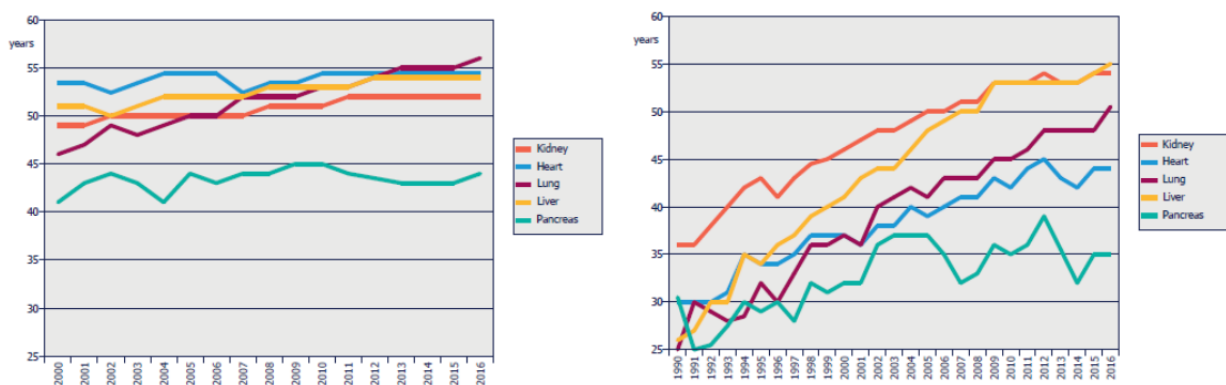


Abb. 3: Links: Graphische Darstellung des medianen Alters eines Patienten auf der Warteliste für das jeweilige Organ im Laufe der Zeit im gesamten Eurotransplant-Gebiet. Rechts: Graphische Darstellung des medianen Alters eines postmortalen Organspenders je Organ im Laufe der Zeit im gesamten Eurotransplant-Gebiet. Der gelbe Graph entspricht dem jeweiligen, medianen Alter bei Lebertransplantationen. Aus Eurotransplant, 2017 (9).

1.1.3 Komplikationen und Prognose

Im Rahmen einer Lebertransplantation ist das Auftreten von Früh- und Spätkomplikationen direkt assoziiert mit einer eingeschränkten Prognose von transplantiertem Organ und Empfänger (10). Frühkomplikationen reichen hierbei von thromboembolischen Ereignissen, Blutungen und Galleleckagen über akute Abstoßungsreaktionen zu Ischämien und Stenosen des Gallengangsystems, sowie nicht zuletzt Infektionen (1, 10-12). Doch neben dem Risiko der Infektion schränken die nach der Transplantation notwendigen Immunsuppressiva selbst durch ihre Nephrotoxizität bis zur Dialysepflichtigkeit, Interaktionen mit anderen Medikamenten, arterielle Hypertonie, sowie ihre Diabetogenität langfristig die Prognose nach einer Transplantation ein (1, 10, 13). Weiterhin wird das Risiko neu entwickelter Tumore durch immunsuppressive Therapien signifikant erhöht und ist zu 30% an der Langzeitmortalität beteiligt (5, 14, 15). Rezidive bei initial maligner Transplantationsindikation zeichnen sich noch für 20% der Langzeitmortalität verantwortlich (5, 13).

Eine klassische, wenn auch unvermeidliche Komplikation der Lebertransplantation stellt zudem der Ischämie-Reperfusionsschaden dar, der in unterschiedlich starker Ausprägung auftritt, wenn das hypoxische Spendergewebe mit sauerstoffreichem Blut des Empfängers reperfundiert wird. Der hierbei entstehende Gewebeschaden kann die Prognose von Spenderorgan und Empfänger nachhaltig beeinflussen (16-19). Dies liegt nicht zuletzt daran, dass der Ischämie-Reperfusionsschaden nicht nur die postoperative Leberfunktion beeinträchtigt, sondern auch in direktem Zusammenhang mit chronischer Transplantatabstoßung, primärer Transplantatfunktionslosigkeit und verzögerter Organfunktion steht (20, 21). Da dies in marginalen Spenderorganen und Empfängern mit einer Vielzahl an Komorbiditäten vermehrt beobachtet werden konnte (5, 13, 22, 23), bedarf es entsprechender Forschungsansätze, um das qualitativ beste Ergebnis aus den aktuell bestehenden Herausforderungen der Organqualität und –quantität zu erzielen.

1.2 Hepatischer Ischämie-Reperfusionsschaden

1.2.1 Grundlagen des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens

Wie bereits dargestellt, stellt der hepatische Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) eine zentrale Komplikation der Lebertransplantation dar, die mit reduzierter Prognose von Spenderorgan und Empfängerüberleben einhergeht (20, 21). Die Lebertransplantation ist jedoch nicht das einzige, chirurgisch relevante Teilgebiet, in dem der IRI eine ausschlaggebende Rolle für die Prognose spielt. Auch ausgedehnte Leberresektionen und Lebertrauma können mit hepatischen IRI einhergehen (20, 24). Sogar der hämorrhagische und hypovoläme Schock, sowie der septische Schock, in dem septisch assoziierte Mikrozirkulationsstörungen zur zellulären Minderperfusion der Leber führen, können zu IRI-bedingtem Leberschaden führen (25, 26). Somit ist der IRI zwar für die Transplantation charakteristisch, jedoch nicht spezifisch.

Entscheidend für das Ausmaß des IRI ist neben anderen Faktoren vor allem die Länge der vorangegangenen Ischämie, also die Zeit mit unzureichender Versorgung eines Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen (27, 28). In dieser Zeit entsteht in den der Ischämie unterworfenen Zellen ein hypoxisches Milieu, welches zum Wechsel des Zellmetabolismus‘ von aerobem auf anaerobem Stoffwechsel führt (20). Der konsekutive Mangel an ATP stellt einen zentralen Aspekt in der Genese des IRI dar (29). Hierdurch und durch die Unterversorgung mit Nährstoffen werden die Zellen über verschiedene Mechanismen vulnerabler und anfälliger.

ger für einen nachfolgenden Schaden, was wiederum die Korrelation des Gewebeschadens mit der Länge der Ischämie erklärt (30, 31). Der eigentliche IRI entsteht allerdings erst in direkter Folge der Reperfusion und ist auch durch diese bedingt (31, 32). Der übermäßige Anfall von sauerstoff- und nährstoffreichem Blut im sauer- und nährstoffarmen Gewebe führt allen voran zur Ausbildung von Sauerstoffradikalen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die wiederum selbst Kaskaden einleiten, die in der Schädigung des Zellgewebes münden (33-35) (vgl. 1.2.2).

Diese Schädigung wird zu einem signifikanten Teil durch inflammatorische Mediatoren, pH-Schwankungen und Mikrozirkulationsprobleme verursacht, welche die Ischämie, durch die sie verursacht werden, noch zusätzlich verstärkt (30). Hierbei spielt allen voran die komplexe Interaktion von Kupferzellen, den lebereigenen Makrophagen, mit neutrophilen Granulozyten, T-Zellen, Endothelzellen, Hepatozyten und dem Komplementsystem eine entscheidende Rolle (31). Die verschiedenen relevanten Interaktionswege sind in Abb. 4 dargestellt und werden in den Folgekapiteln näher erläutert.

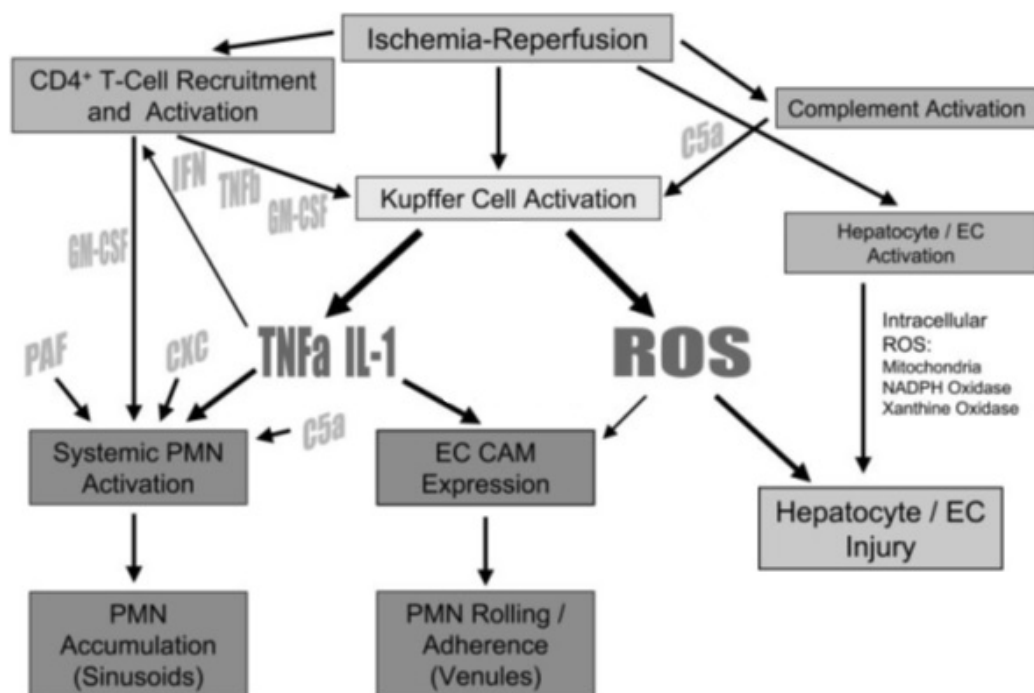


Abb. 4: Schematische Darstellung der wichtigsten, für die Ausbildung des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens verantwortlichen Signalketten. EC: Endothelzellen; ROS: reaktive Sauerstoffspezies; CAM: Zelladhäsionsmoleküle; PMN: polymorphonukleäre, neutrophile Leukozyten; TNF: Tumornekrosefaktor; IFN: Interferone; GM-CSF: Granulozytenmakrophagenkolonien-Stimulationsfaktor; PAF: Plättchenaktivierungsfaktor; CXC: CXC-Chemokine; IL: Interleukin. Aus Jaeschke, 2003 (31).

1.2.2 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen im physiologischen und pathologischen Ablauf verschiedener Zellzyklen entscheidende Rollen und sind hierbei neben dem IRI auch beispielsweise charakteristisch in der Onkogenese, Inflammation und dem physiologischen Altern zu finden (36-38). Zu den wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies im IRI zählen das Superoxidanion-Radikal ($\bullet\text{O}_2^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxyl-Radikal ($\bullet\text{OH}$), welche durch Reduktion und Oxidation ineinander übergehen können (39) (Abb. 5). Sauerstoff wird für sämtliche aeroben Stoffwechselprozesse des Organismus benötigt, stellt jedoch chemisch betrachtet auch einen wohl bekannten Elektronenakzeptor dar, so dass die Entstehung von ROS zu einem gewissen Teil unvermeidlich ist (39). Ein spontaner, univalenter Elektronentransfer führt zur Reduktion von Sauerstoff zum Superoxidanion-Radikal, welches in der weiteren Folge zu Wasserstoffperoxid dismutieren kann (39). Diese Reaktion wird üblicherweise durch die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert (40). Wasserstoffperoxid kann in einer eisenabhängigen Reaktion zum Hydroxyl-Radikal weiterverstoffwechselt werden, welches durch Protonenaufnahme erneut ein Wassermolekül entstehen lässt (39). ROS werden allerdings im natürlichen Organismus nicht ausschließlich in Wasser umgewandelt, sondern begünstigen durch ihre Radikalwirkung andere Stoffwechselprozesse, die wiederum selbst Zellschaden anrichten (30, 31). Sind die Mechanismen, die ROS im Sinne weiterer Redox-Schritte in Richtung Wasser verstoffwechseln, im Vergleich zu jenen, die neue ROS ausbilden, unterrepräsentiert, spricht man von „oxidativem Stress“ (41).

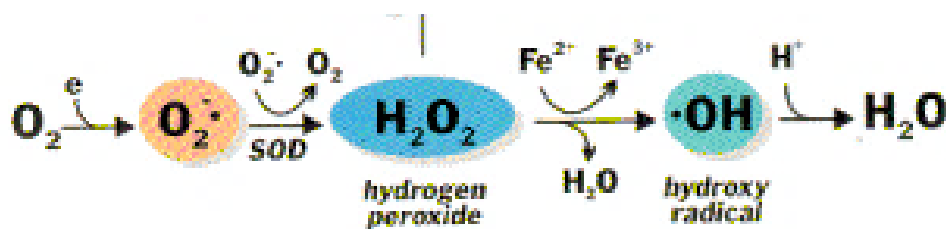


Abb. 5: Schematische Darstellung der chemischen Formation der reaktiven Sauerstoffspezies Superoxidanion-Radikal ($\bullet\text{O}_2^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl-Radikal ($\bullet\text{OH}$), sowie deren Stoffwechselkaskade zu Wasser (H_2O). Aus R&D System, 1997 (41).

Im hepatischen IRI existieren mehrere, nachgewiesene Quellen, die ROS produzieren und somit den hepatischen Gewebeschaden einleiten können. Die Kupffer-Zellen der Leber werden durch Ischämie und Reperfusion aktiviert und sind somit in der Lage, selbstständig ROS zu produzieren und in das Gefäßsystem freizusetzen (42-45). Zugleich stellen sie die Hauptquelle für ROS im hepatischen IRI dar. Weiterhin führen die von den Kupffer-Zellen ausge-

schütteten proinflammatorischen Mediatoren zu einem Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Leber (30). Hierdurch können ebenfalls ROS aus den Neutrophilen freigesetzt werden (30, 44, 45). Neben der inflammatorischen Antwort führt der vermehrte Anfall von Neutrophilen, vor allem im Bereich der Sinusoide, zu einer mediatorvermittelten Mikrozirkulationsstörung, die die bestehende Gewebischämie verlängert und somit in der weiteren Folge zu einem vermehrten Anfall von ROS führt (30, 46, 47). Auch intrazelluläre ROS-Quellen sind im Rahmen des IRI an der Ausbildung des oxidativen Stresses beteiligt. Hierbei sind drei intrazelluläre Komponenten von zentraler Bedeutung: Die Xanthinoxidase, die NADPH-Oxidase und das Mitochondrium (31). Während der Ischämie werden die schwindenden ATP-Reserven der Zellen zu Hypoxanthin umgebaut (29, 48). Fällt im Rahmen der Reperfusion wieder Sauerstoff an, katalysiert Xanthinoxidase die Oxidierung zu Xanthin und Harnsäure, wodurch ROS anfallen (29, 48). Im Rahmen der Phagozytoseaktivität der Endothelzellen und Hepatozyten formiert sich zudem intrahepatische ROS via NADPH-Oxidase (49, 50). Zudem besitzen Mitochondrien die Fähigkeit durch ihre ATP-Synthesefunktion selbstständig intrazelluläre ROS zu produzieren (51, 52).

Der Gewebeschaden, der mit einem vermehrten Anfallen an ROS einhergeht, beruht klassischerweise auf unkontrollierter Lipidperoxidation von membranständigen Fettsäuren, wodurch Membran- und Zellintegrität negativ beeinflusst werden, was wiederum zum Zelltod führt (35, 53, 54). Lange Zeit wurde dieser zentrale Effekt des ROS-vermittelten Zelltod im IRI der vermehrten Leukotriensynthese durch die 5-Lipoxygenase zugesprochen (55-58). In den vergangenen Jahren verlagerte sich der Fokus der Forschung in diesem Zusammenhang jedoch zunehmend auf andere, mutmaßlich potentere Lipoxygenasen wie die 12/15-Lipoxygenase (vgl. 1.3.2) (59, 60).

1.2.3 Involvierte Mediatormechanismen

Wie bereits in Abb. 4 dargestellt, tragen diverse Mechanismen zur Ausbildung des zellulären Schadens nach Ischämie und Reperfusion im Lebergewebe bei (31). Eine ganz zentrale Rolle nehmen hierbei die leberständigen Kupfferzellen ein, die durch Ischämie aktiviert werden können und somit ROS produzieren (43, 44, 61). Diese können durch Oxidation von Pyridinnukleotiden und Akkumulation von Calcium in den Mitochondrien den direkten Untergang von Hepatozyten und Endothelzellen einleiten (62, 63). Dies wiederum führt zur vermehrten Bildung von Superoxid-Radikalen in den Mitochondrien, was zur Dysfunktion der

mitochondrialen Permeabilitätsporen führt, einem Ausgangspunkt verschiedener Formen des Zelltods (vgl. 1.2.4) (30). Weiterhin haben die Kupffer-Zellen die Eigenschaft, in der Reperfusionsphase proinflammatorische Zytokine auszuschütten, allen voran Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1) (64, 65). Diese Zytokine vermitteln ihre proinflammatorische Wirkung, indem sie neutrophile Granulozyten in das Lebergewebe rekrutieren und aktivieren (66, 67). Diese sammeln sich hierdurch vor allem in den Sinusoiden und Venolen an, verringern somit den Blutfluss und führen zu Mikrozirkulationsstörungen, wodurch die Ischämie im Gewebe verstärkt wird (31). Darüber hinaus werden durch das Vorhandensein der oben genannten Zytokine sogenannte Zelladhäsionsmoleküle (CAM) von den Endothelzellen und Hepatozyten an deren Oberfläche ausgebildet, welche mit den Oberflächenmolekülen der neutrophilen Granulozyten in Bindung gehen können (68, 69). Diese vermitteln einerseits eine Endothelzelladhärenz von Neutrophilen, sowie nach Extravasation sekundär auch eine Interaktion zwischen Neutrophilen und Hepatozyten (70, 71). Neben VCAM-1, E-Selektin und P-Selektin stellt in diesem Zusammenhang sicherlich ICAM-1 das relevanteste CAM dar, welches nach Ischämie und Reperfusion verstärkt auf Endothelzellen der Venolen und Hepatozyten der Sinusoide exprimiert wird und in der weiteren Folge mit den auf den Neutrophilen ausgebildeten β_2 -Integrinen einen festen Komplex bildet (68, 72, 73). Durch diese Adhärenz an die jeweiligen Zelltypen werden die Mikrozirkulationsstörungen verstärkt, somit die ROS-Bildung zusätzlich gefördert und im weiteren Verlauf durch die Ausbildung von Proteasen der Abbau des jeweiligen Zelltyps eingeleitet (31).

Ein weiterer Signalweg in der Mediation des IRI ist die Aktivierung des Komplementsystems, welches über die Aktivierung von Neutrophilen und Kupfferzellen in der Reperfusionsphase indirekt zu einer vermehrten ROS-Produktion führt (31, 74, 75). Zudem werden auch CD4-positive T-Lymphozyten postischämisch aktiviert (31, 76). Diese produzieren ebenfalls proinflammatorische Zytokine, welche wiederum Kupfferzellen aktivieren und den Neutrophileneinstrom in die Leber verstärken (31, 76, 77). Dieser Einstrom von neutrophilen Granulozyten wird ferner durch das vermehrte Aufkommen von CXC-Chemokinen verstärkt, die in den Kupfferzellen und Hepatozyten bereitgestellt werden (66, 78, 79). Endothelzellen wiederum sind in der Lage inflammatorische Lipidmediatoren wie den Plättchenaktivierungsfaktor (PAF) zu produzieren, welche in der Lage sind die Formation von Superoxidradikal in neutrophilen Granulozyten zu stimulieren und das adhärenzfördernde β_2 -Integrin auf deren Ober-

fläche zu aktivieren (42, 80, 81). Über die hier dargestellten, komplexen Interaktionen zwischen Kupffer-Zellen, Leukozyten, Hepatozyten und Endothelzellen wird der Zelluntergang des IRI eingeleitet.

1.2.4 Involvierte Formen des Zelltods

Während lange Zeit angenommen wurde, dass die meisten, für den hepatischen IRI relevanten Zelltodmechanismen zu Nekrose führen, konnten verschiedene Arbeitsgruppen in den vergangenen Jahren zeigen, dass andere Formen des Zelltods ebenfalls im Rahmen der Reperusionsphase eintreten (30, 82, 83). Das Verständnis dafür, dass verschiedene Zelltodmechanismen in die Entstehung des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens involviert sind, ist essentiell, um sinnvolle Interventionsstrategien zur Minimierung des hepatischen IRI deuten und entwickeln zu können.

1.2.4.1 Nekrose

Die onkotische Nekrose ist hierbei charakterisiert durch eine postischämische Zellschwellung mit konsekutiver Plasmamembranruptur, was wiederum mit einer flächigen Entzündungsreaktion einhergeht (95). Den klassischen Ausgangspunkt hierfür stellt dabei der zuvor beschriebene Mangel an ATP aus mitochondrialen Quellen dar. Aufgrund dieses relativen ATP-Mangels werden Glycin-empfindliche Anionenkanäle geöffnet, wodurch es zu einem massiven Einstrom von Anionen und Wasser in die Zelle kommt (30, 84). Die Plasmamembran kann dem durch die Zellschwellung verursachten, intrazellulären Druck in der weiteren Folge nicht mehr Stand halten und rupturiert im Bereich zuvor entstandener Membranausstülpungen (85, 86). Die Barrierefunktion der Zellmembran ist somit aufgehoben und intrazelluläre Inhalte wie Enzyme können austreten, was zu einer inflammatorischen Antwort im Extrazellularraum führt und somit die umliegenden Zellen affektiert, die wiederum selbst nekrotisch werden können (30, 87).

1.2.4.2 Apoptose

Im Gegensatz hierzu ist die Apoptose dadurch gekennzeichnet, dass sie zwar zu einer mitochondrialen Schwellung führt, die Zelle selbst jedoch durch verschiedene Kaskaden schrumpft, der Zellkern kondensiert und sowohl Zellkern, als auch Zytoplasma in kleinere Teilstücke gespalten werden (88). Somit kommt es klassischerweise nicht zu einem Austritt intrazellulärer Enzyme, wodurch auch eine umgebende Entzündungsreaktion ausbleibt (95). Üblicherweise wird Apoptose auch als programmierter Zelltod bezeichnet, da er durch eine

Reihe biochemischer Kaskaden charakterisiert ist (88, 89). Prinzipiell unterscheidet man hierbei zwischen extrinsischer, also über extrazelluläre Signale vermittelte Apoptose, bei der verschiedene Zelltodrezeptoren in der Zellmembran zu einer konsekutiven Caspasenaktivierung führen, und intrinsischer Apoptose, bei welcher mitochondrial auf intrazelluläre Stresssignale reagiert wird (90). Klassische Vertreter von proapoptotischen Proteinen, die auf extrazelluläre Stresssignale wie Strahlung, oxidativen Stress oder toxische Substanzen reagieren, sind ERK und JNK, die wiederum selbst extrinsisch, wie auch intrinsisch Apoptose vermitteln können, indem sie zuvor von MAP-Kinasen phosphoryliert und aktiviert wurden (90-92).

Eine besondere Stellung in der Apoptoseentwicklung während des hepatischen IRI nimmt neben teils unerforschten Kaskaden allen voran Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- α) ein, da TNF- α nach Bindung an den entsprechenden Zellrezeptor unter anderem die proapoptotischen Proteine Caspase-8 und in der weiteren Folge Caspase-3 aktiviert (30, 93). In Hepatozyten führt diese Kaskade zu einer intrinsischen Apoptoseverstärkung (94). So führt die Caspase-8-Aktivierung zu einer vermehrten Produktion von löslichen Proteinen wie Cytochrom C oder AIF im Zwischenmembranraum der Mitochondrien (95, 96). Andererseits führt die TNF- α -Kaskade zu einer Öffnung der Poren innerhalb der äußeren Mitochondrienmembran, was als mitochondriale Permeabilitätstransition (MPT) bezeichnet wird (30). Hierdurch kommt es zu einer raschen Depolarisation und Schwellung der Mitochondrien, wodurch eine Ruptur der mitochondrialen Außenmembran bedingt wird (30). Das nun in das Zytoplasma gelangte Cytochrom C bildet mit AIF und ATP einen als Apoptosom bezeichneten Komplex, der über Zwischenschritte zur Aktivierung von Caspase-3 führt (30, 94). Caspase-3 selbst kann nach Spaltungsaktivierung neben anderen Caspasen folglich Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) spalten, aktivieren und somit zum Schrumpfen der Zelle, sowie Hydrolyse und Spaltung der DNA führen (30, 97-99).

1.2.4.3 Nekrapoptose

Die Unterscheidung zwischen den beiden genannten Formen des Zelltods ist nicht immer eindeutig, da gewisse Eigenschaften sowohl bei onkotischer Nekrose, als auch bei Apoptose anzutreffen sind (90). So kann auch Apoptose zeitweise durch Neutrophilenmigration oder Ausschüttung von CXC Chemokinen eine sonst für Nekrose typische Entzündungsreaktion auslösen (100-102). Andererseits kann auch in nekrotischen Zellen mitochondriales

Cytochrom C freigesetzt werden (103). Noch relevanter für den hepatischen IRI erscheint jedoch die Erkenntnis, dass beide Zelltodformen ineinander übergehen können, weshalb sich der Begriff der Nekrapoptose in den vergangenen Jahren etabliert hat (30, 104, 105). Ausgangspunkt hierfür stellt die zuvor beschriebene MPT dar. Während der Reperfusion steigt der zuvor ischämisch-saure pH-Wert und Calciumgehalt der Zelle wieder an, wodurch die MPT eingeleitet wird (30, 106, 107). Durch den hierbei stattfindenden Verbrauch von ATP wird onkotische Nekrose begünstigt (107). Ist in der Zelle jedoch ausreichend ATP vorhanden, kann das durch Mitochondrienschwellung freigesetzte Cytochrom C ATP-abhängige Caspasekaskaden initiieren (95). Daher wird der intrazelluläre ATP-Gehalt auch als „Schalter zwischen Apoptose und Nekrose“ beschrieben (30, 108, 109). So wurde postuliert, dass die Art des Zelluntergangs mit der Anzahl der von MPT betroffenen Mitochondrien korreliert. Sind nur wenige Mitochondrien betroffen, können diese per Autophagie entfernt werden. Bei größerem Schaden wird primär die ATP-abhängige Apoptose eingeleitet. Ist der Schaden jedoch so groß, dass der allgemeine ATP-Gehalt deutlich sinkt, ist von einer konsekutiven Nekrose im Gewebe auszugehen (Abb. 6) (30, 108, 109).

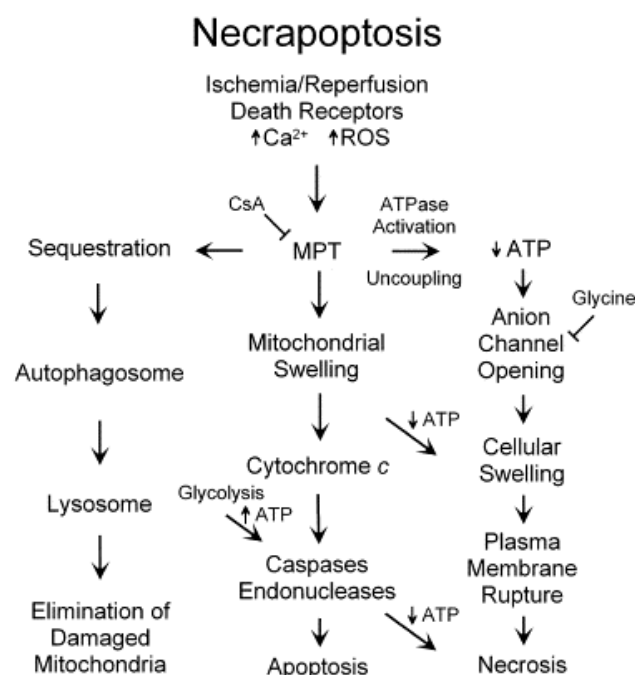


Abb. 6: Schematische Darstellung der wichtigsten, für die Ausbildung der Nekrapoptose nach hepatischem Ischämie-Reperfusionsschaden verantwortlichen Ereignisse. MPT: Mitochondriale Permeabilitätstransition; CsA: Cyclosporin A; ATPase: Adenosintriphosphatase; ATP: Adenosintriphosphat; ROS: Reaktive Sauerstoffspezies. Aus Jaeschke et al., 2003 (30).

1.2.4.4 Ferroptose

In den letzten Jahren ist es gelungen, die etablierten Zelltodarten hinsichtlich ihrer exakten, molekularen Signalketten zu subklassifizieren (90). Zudem konnten gänzlich neue Formen der Zelltodentwicklung beschrieben werden. Hierbei ist vor allen Dingen die Ferroptose zu erwähnen, die vor wenigen Jahren erstbeschrieben wurde (110, 111). Im Gegensatz zu den beschriebenen Zelltodarten weisen ferroptotische Zellen keine Zytoplasmaschwellung und Plasmamembranruptur auf wie bei Nekrose, ebenso ist kein apoptosetypischer Cytochrom C-Ausstrom oder Caspasenaktivierung festzustellen (110, 112). Der Zellkern präsentiert sich ebenfalls von normaler Größe und Beschaffenheit (113). Jedoch kann man in der Ferroptose deutlich verkleinerte Mitochondrien mit erhöhter Membrandichte und teils rupturierter Außenmembran antreffen (110, 112, 113). Auch bei der Entstehung der Ferroptose scheinen reaktive Sauerstoffspezies eine zentrale Rolle zu spielen (110, 111, 114). Im Zentrum der Zelltodentwicklung steht hierbei intrazelluläres Eisen, welches, wenn es nicht durch Chelatisierung in einen unschädlichen Zustand übergegangen ist, zu einer übermäßigen Produktion intrazellulärer ROS führt, wodurch der Untergang von Zellorganellen hauptsächlich bestimmt ist (110, 113, 114). Diese ROS-Bildung erfolgt durch die Aktivität von spezifischen Lipidperoxidasen, welche in Anwesenheit von intrazellulärem Eisen membranständige Fettsäuren aus den Zellmembranen spalten und somit die Zellintegrität relevant schädigen können (114). Die Entstehung von Ferroptose scheint durch den Einfluss von Hitzeschockproteinen, Transferrin, Cystein und Glutamin beeinflusst zu sein und die Aktivierung von AIF zu bedingen (113-115).

1.3 Glutathion-Peroxidase-4-abhängige Signalkaskade

In den vergangenen Jahren entstand in Bezug auf die Zelltodvermittlung das Konzept, dass unkontrollierte Lipidperoxidation für den massiven Anfall von ROS auf Membranebene und die konsekutiv durch die MPT verursachten Membran- und Zellschäden maßgeblich mitverantwortlich sein könnte (30, 35, 53, 54, 116). Das Zusammenspiel von Glutathion-Peroxidase-4 (Gpx4) und 12/15-Lipoxygenase (12/15-LOX) auf die membranständigen Fettsäuren, explizit auf den Arachidonsäurestoffwechsel, scheint in diesem Zusammenhang von hoher Relevanz zu sein, da bereits auf zellulärer Ebene, sowie in anderen Organsysteme gezeigt werden konnte, dass diese Mediatoren bei Ischämie und Reperfusion interagieren (115, 117-119).

1.3.1 Arachidonsäure-Metabolismus

Den Ausgangspunkt stellt hierbei der Arachidonsäure-Metabolismus dar. Die Arachidonsäure ist eine vierfach ungesättigte Fettsäure, wird aus den essentiellen Fettsäuren Linol- oder γ -Linolensäure per Oxidation gebildet und reguliert die Viskosität zellulärer Membranen (120, 121). Zudem ist die Arachidonsäure hormonell aktiv an der Kontrolle der meisten Lebensvorgänge beteiligt, da sie als Substrat der Eicosanoid-Biosynthese dient. Die bekanntesten Vertreter der Eicosanoide sind Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene, die unter anderem an der Entstehung von Hämostase, Entzündung, Allergie und sogar Tumoren beteiligt sind (120, 122-127). Um Eicosanoide zu synthetisieren benötigt der Organismus ein extrazelluläres Signal. Dieses führt dazu, dass ungesättigte Fettsäuren, die in Zellen stets als Phospholipide in der Zellmembran gespeichert sind, durch die intra- oder extrazelluläre Phospholipase A₂ als Arachidonsäure aus der Membran freigesetzt werden (120, 128, 129). Diese wird in der weiteren Folge unmittelbar von Monooxygenasen, Lipoxygenasen, Cyclooxygenasen oder ohne enzymatische Katalyse zu den jeweiligen, enzymspezifischen Eicosanoiden weiterverarbeitet (120, 130). Die Arachidonsäure- und Eicosanoidbiosynthese ist in Abb. 7 schematisch dargestellt.

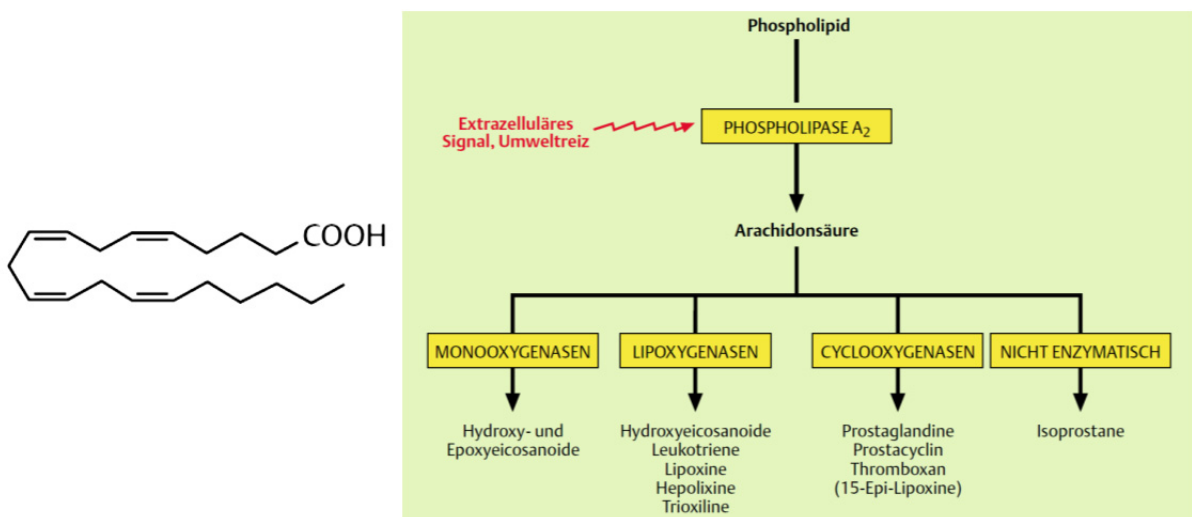


Abb. 7: Links: Chemische Strukturformel der Arachidonsäure. Rechts: Schematische Darstellung der Arachidonsäure- und Eicosanoidbiosynthese. Aus Marks, 2000 (120).

1.3.2 Die Enzymgruppe der Lipoxygenasen

Eine besondere Rolle im Arachidonsäurestoffwechsel nehmen die Lipoxygenasen (LOX) ein, die sich unter anderem für die Leukotriensynthese verantwortlich zeigen (vgl. Abb. 7). LOX sind Nichthäm-Eisenproteine, die die Übertragung von zwei Sauerstoffatomen auf ungesättigte Fettsäuren stereospezifisch katalysieren (120). Das Produkt dieser Reaktion sind Hydro-

peroxide, welche in der weiteren Folge reduziert werden oder Epoxide bilden können (120). Eine Klasse dieser Epoxide sind die sogenannten Hepoxiline, die aus der 12S-Hydroperoxyeicosatetraensäure (12S-HpETE), dem Produkt der enzymatischen Oxidierung von Arachidonsäure mit 12-LOX, gebildet werden können (120). Hepoxiline können den Calciumgehalt im Zytoplasma einer Zelle durch vermehrten Ausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum erhöhen, was unter anderem für endokrine Sekretionsvorgänge und Kontraktion glatter Muskelzellen von Relevanz ist (120). Die 15-LOX, die unter anderem in Retikulozyten, Kardiomyozyten und Endothelzellen zu finden ist, wird im Gegensatz hierzu über proinflammatorische Mechanismen mit Atherosklerose, Thromboseneigung und Glomerulonephritis in Verbindung gebracht (131-134). Die 8-LOX scheint vor allem in Ausbildung maligner Zellen der Epidermis, sowie inflammatorischer Hauterkrankungen eine Rolle zu spielen (123, 135, 136). Die bisher am meisten erforschte und daher lange Zeit als wichtigste bezeichnete Lipoxygenase ist ohne Zweifel die 5-LOX, da sie das Schlüsselenzym zur Leukotriensynthese aus Arachidonsäure darstellt (137). Aus der Reaktion derselbigen mit der 5-LOX entsteht als Primärprodukt 5S-HpETE, welche nach nochmaliger Oxidierung durch 5-LOX zu Leukotrien A₄ (LTA₄) und konsekutiv enzymatisch zu den weiteren Leukotrienen verstoffwechselt wird (120). Leukotrien B₄ (LTB₄) ist hierbei als zentraler, unspezifischer Entzündungsmediator zu nennen, während die weiteren Leukotriene äußerst potente Vaso- und Bronchokonstriktoren darstellen, sowie die Gefäßpermeabilität erhöhen (120, 137-139).

1.3.3 12/15-Lipoxygenase als Initiator des Zelltods nach oxidativem Stress

In letzter Zeit ist der Fokus der Forschung zunehmend auf die Rolle der dualen 12/15-LOX in Ischämie-Reperfusionsmodellen geraten (115). 12/15-LOX wurden in einer Vielzahl an Geweben, darunter Retikulozyten, eosinophilen Granulozyten, Epithelzellen, Monozyten und Makrophagen, detailliert beschrieben und können von T-Helfer-Zytokinen induziert werden (140). Zum bisherigen Forschungsstand sind 12/15-LOX unter anderem mit inflammatorischen Erkrankungen, Diabetes, Atherosklerose, Osteoporose, Hypertension und Tumorgenese vergesellschaftet (140). Die 12/15-LOX kann, im Gegensatz zu 12-LOX und 15-LOX, sowohl am zwölften, als auch am 15. Kohlenstoffatom der Arachidonsäure oxidieren und somit neben den Produkten der jeweiligen singulären Enzymwege auch 12S/15S-Hydroperoxyeicosatetraensäure (12S/15S-HpETE) synthetisieren (60).

Von erhöhter Relevanz ist hierbei die Tatsache, dass 12/15-LOX diese Reaktion vor allem in mitochondrialen Membranen katalysiert und dies auch mit komplexen Lipidestern in Membranen und Lipoproteinen bewältigt, was ihr wiederum ein wichtiges Alleinstellungsmerkmal gegenüber anderen LOX verschafft (59, 141, 142). Die entstandene 12S/15S-HpETE konnte auf Zellebene als wichtiger Ausgangsmetabolit zur Zelltodinduktion und als zentrale Lipidperoxidquelle nach IRI in vitro nachgewiesen werden (vgl. 1.2.4) (115, 141). Der vermehrte Anfall von 12S/15S-HpETE verstärkt somit das Peroxidmilieu in Zelle und Membran, wodurch die eisenabhängige Aktivierung von 12/15-LOX weiter zunimmt und somit zusätzliche Lipidperoxide produziert werden (141). Es konnte gezeigt werden, dass diese vermehrte Lipidperoxidation in direktem Zusammenhang mit zunehmendem Zelltod, potentiell via mitochondrienabhängiger AIF-Mediation und somit potentiell Ferroptose, steht (115, 141). Die genauen Zelltodmediatoren sind hierbei zum aktuellen Zeitpunkt jedoch unklar, es wird jedoch neben 12S/15S-HpETE die Bildung von Hepoxilinen (vgl. 1.3.2) und eine Assoziation mit Caspase-Aktivierung diskutiert (141, 143, 144). In jedem Fall konnte nachgewiesen werden, dass die Zelltodentwicklung nach oxidativem Stress auf zellulärer Ebene eine funktionsfähige 12/15-LOX benötigt, da 12/15-LOX-Knockout-Zellen trotz oxidativen Stresses nicht zugrunde gehen (115, 145).

1.3.4 Die Rolle des Glutathions und der Glutathionperoxidase-4

Glutathion ist ein in der Leber synthetisiertes, schwefelhaltiges Tripeptid, welches die drei Aminosäuren Glutaminsäure, Glycin und Cystein enthält, in allen Zellen des Körpers anzutreffen ist und dessen antioxidative Wirkung schon länger bekannt ist (146-149) (Abb. 8). Diese beruht darauf, dass die im reduzierten Glutathion enthaltene Sulfhydrylgruppe ein potenter Elektronendonator ist, wodurch es unter eigener Oxidation als Radikalfänger funktioniert (146, 149). Das Glutathion ist an DNA-Reparatur-Mechanismen beteiligt, dient der Bio-transformation toxischer Substanzen, stellt eine natürliche Aminosäurenreserve für die Proteinsynthese dar und ist relevant für Alterungsprozesse (146-150).

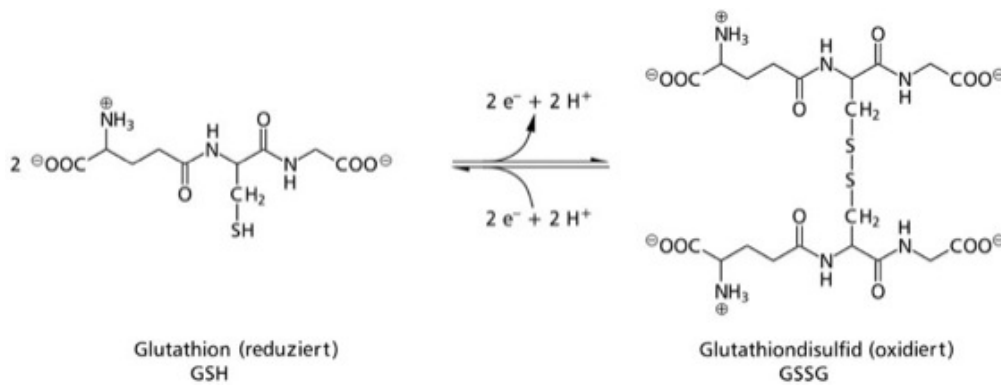


Abb. 8: Schematische Darstellung der von Glutathionperoxidase katalysierten Oxidation des reduzierten Glutathions (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG) mitsamt chemischen Strukturformeln. Aus Spektrum, 2001 (146).

Die Oxidation von reduziertem Glutathion erfolgt zu einem großen Teil durch Enzyme der Selenoproteinfamilie der Glutathionperoxidasen (Gpx) (151) (Abb. 8). Von den acht bekannten Gpx ist sicherlich die Glutathionperoxidase-4 (Gpx4) aufgrund ihrer breiten Substratspezifität und ihrer Wirkung als Phospholipidperoxidase einzigartig, da sie auch komplexe Lipidhydroperoxide mittels Proteinthiolen wie GSH reduzieren kann (152, 153). Gpx4 wurde von Ursini im Jahre 1982 erstbeschrieben und kommt im Zytosol, den Mitochondrien und im Zellkern vor (141). Unter den bekannten Selenoproteinen ist die Gpx4 dasjenige, welches als unbedingt überlebensnotwendig im Embryonalstadium von Säugetieren erachtet werden muss und den meisten Effekt auf regelrechte Gewebefunktionen zu haben scheint (151, 152, 154-157).

Da die Gpx4 die einzige Gpx ist, die membranständige Lipidhydroperoxide verarbeiten kann, kann sie in der Wirkung als antagonistisch zur 12/15-LOX betrachtet werden (115, 141, 158). Sie ist nämlich in der Lage die 12S/15S-HpETE in die entsprechende 12S/15S-Hydroxyeicosatetraensäure (12S/15S-HETE) zu reduzieren (141). Während 12S/15S-HpETE den Zelltod einleitet, wirkt sich 12S/15S-HETE nicht schädlich auf den Zellmetabolismus aus (141). Diese Beobachtung konnte auf zellulärer Ebene bestätigt werden. Gpx4^{-/-}-Knockout-Zellen gingen nach Zugabe von HpETE rasch unter, während die Behandlung mit HETE keinen Effekt zeigte (159). Im Tierversuch konnte bei Gpx4-depletierten Tieren massive Lipidperoxidation und damit einhergehender Zelltod nachgewiesen werden (115). Wenn jedoch Säugetiere Gpx4 überexprimieren, ist eine deutlich erhöhte Toleranz gegen oxidativen Stress die Folge (160). Eine Therapie mit GSH, dem obligaten (Co-)Substrat der Gpx4, konnte bereits hepatoprotektive Effekte nach warmer Ischämie zeigen, wenngleich zu diesem Zeitpunkt das Zusammenspiel aus Gpx4 und 12/15-LOX noch nicht bekannt war (161, 162). Eine kanadische Arbeits-

gruppe konnte 2016 diese Beobachtungen dahingehend bestätigen, dass eine eingeschränkte Glutathionbiosynthese mit einer deutlich erhöhten oxidativen Stressantwort und damit einhergehend mit weit ausgeprägterem Leberzellschaden nach IRI vergesellschaftet ist (163). Die Arbeitsgruppe um Alexander Seiler konnte in einem Knockout-Mausmodell an Nervenzellen darüber hinaus gehend zeigen, dass Gpx4 einen direkten, hemmenden Einfluss auf die 12/15-LOX-Aktivität und die damit verbundene Lipidoxidation zu haben scheint (115). Zudem führt Gpx4 in der Zellmembran zur Abnahme des Peroxidmilieus, was wiederum die Aktivierung der 12/15-LOX limitiert (141). Somit konnte beschrieben werden, dass sich Gpx4 und 12/15-LOX auf einzigartige Weise gegenseitig regulieren und den lipidperoxidbasierten Zelltod nach oxidativem Stress medieren (115, 141) (Abb. 9). Diese regulatorische Funktion der Gpx4-abhängigen Signalkaskade konnte im hepatischen IRI bislang jedoch noch nicht suffizient erklärt werden.

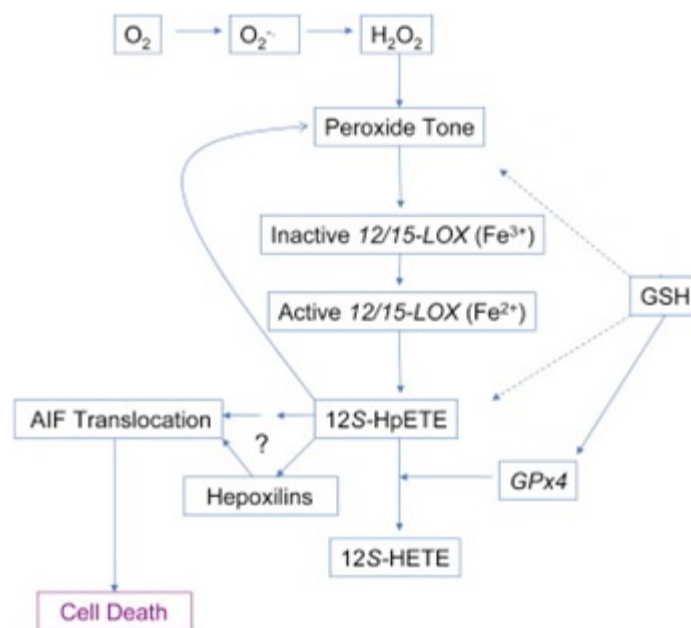


Abb. 9: Schematische Darstellung der Interaktion von 12/15-LOX und Gpx4 im Rahmen der lipidperoxidbasierten Zelltodentwicklung innerhalb der Gpx4-abhängigen Signalkaskade. Gestrichelte Pfeile: Hemmung; 12/15-LOX: 12/15-Lipoxygenase; GPx4: Glutathionperoxidase 4; 12S-H(p)ETE: 12S(/15S)-Hydro(pero)xyeicosatetraensäure. Aus Loscalzo, 2008 (141).

1.3.5 Relevanz in extrahepatischen Organsystemen

Jedoch konnten die hier beschriebenen Zusammenhänge bereits in anderen Organsystemen nach Ischämie und Reperfusion sichtbar gemacht werden. So konnte gezeigt werden, dass zerebraler IRI zu einer deutlichen 12/15-LOX-Aktivitätserhöhung und neuronaler Zellschädigung führt (59, 117, 145, 164). Im Umkehrschluss gelang es mehreren Arbeitsgruppen, zu zeigen, dass die Inhibition von 12/15-LOX eine signifikante Abschwächung neuronalen Zell-

tods nach Ischämie und Reperfusion zur Folge hat (118, 145, 165). Die Folgen der erhöhten 12/15-LOX-Aktivität nach zerebralem IRI sind unter anderem mit einer gestörten Blut-Hirn-Schranke und Hirnödementwicklung vergesellschaftet (166, 167). Auch am Herzen zeigte die spezifische Inhibition von 12/15-Lipoxygenase eine signifikante Abnahme untergehender Kardiomyozyten nach Ischämie und Reperfusion (119). Im Umkehrschluss konnte mit Hilfe einer transgenen Gpx4-Überexpression in Herzzellen der Effekt IRI-assoziierter kardialer Dysfunktion abgeschwächt werden (168).

1.3.6 Baicalein

Eine potente und spezifische Hemmung der 12/15-Lipoxygenase ist durch den Einsatz von Baicalein möglich (169). Baicalein ist ein bioaktives Flavonoid, das aus der Wurzel der *Scutellaria baicalensis* gewonnen wird und beispielsweise in der Kräutermischung Sho-saikoto schon lange Zeit in der traditionell chinesischen und japanischen Medizin Verwendung findet (170-173) (Abb. 10). Mit zunehmender Relevanz der evidenzbasierten Medizin konnten in Baicalein jedoch auch antivirale, antioxidative, antiinflammatorische, antithrombotische und antiproliferative Eigenschaften nachgewiesen werden, wobei die genauen Wirkmechanismen lange Zeit im Verborgenen blieben (172, 174-176). Es konnte gezeigt werden, dass eine Baicalein-Therapie den oxidativen Stress in Kardiomyozyten nach Hypoxie und Reoxygenation vermindern und die Auswirkungen eines Endotoxin-Schocks auf den Organismus abmildern kann (170, 172, 177). Ferner wurden deutliche antiproliferative Effekte in Bezug auf hepatische Tumorzellen nachgewiesen (173, 178). In letzter Zeit konnte Baicalein ebenfalls als Ferroptose-Inhibitor beschrieben werden, was mutmaßlich auf die hemmende Wirkung auf die 12/15-LOX zurückzuführen ist (179, 180).

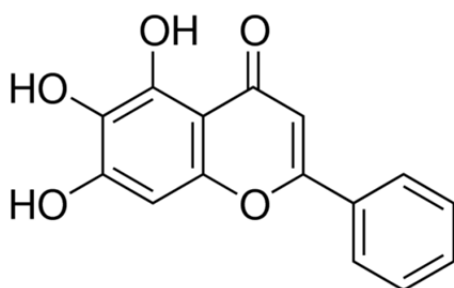


Abb. 10: Links: Chemische Strukturformel von Baicalein. Aus Merck, 2008 (181). Rechts: Fotografie von *Scutellaria baicalensis*, der Mutterpflanze des Baicaleins. Aus Floral Encounters, 2016 (182).

1.4 Tacrolimus

1.4.1 Entwicklung und Indikation

Tacrolimus, auch FK506 genannt, wurde 1984 in Japan aus einer Kultur des Pilzes *Streptomyces tsukubaensis* extrahiert und stellt heute eines der meistverwendeten Immunsuppressiva dar (183, 184). Tacrolimus ist ein neutrales Makrolid und zyklisches Polypeptid, welches aus 11 Aminosäuren besteht und als Calcineurininhibitor fungiert (183-185) (Abb. 11). Als solcher hat es aufgrund seiner deutlich höheren Potenz bei niedrigerer Konzentration und niedrigerem Nebenwirkungsprofil dem zuvor etablierten Calcineurininhibitor Cyclosporin in der Immunsuppression mittlerweile den Rang abgelaufen (183, 186, 187). Schon kurz nach dessen Entdeckung wurden für Tacrolimus immunsuppressive und inhibitorische Effekte auf die Zytokine Interleukin-2 (IL-2), IL-3 und Interferon- γ , sowie das T-Zell-Wachstum nachgewiesen (183, 186).

In Deutschland ist Tacrolimus derzeit in Tabletten- und intravenöser Darreichungsform hauptsächlich als Immunsuppressivum zur Behandlung und Prävention von Abstoßungsreaktion in der Transplantationsmedizin zugelassen (188). Zudem besteht eine weitere Indikation zur topischen Behandlung des schweren atopischen Ekzems (188). Darüber hinaus wird Tacrolimus mittlerweile als Zweitlinientherapie bei schweren, therapierefraktären Verläufen der Colitis ulcerosa eingesetzt (189).

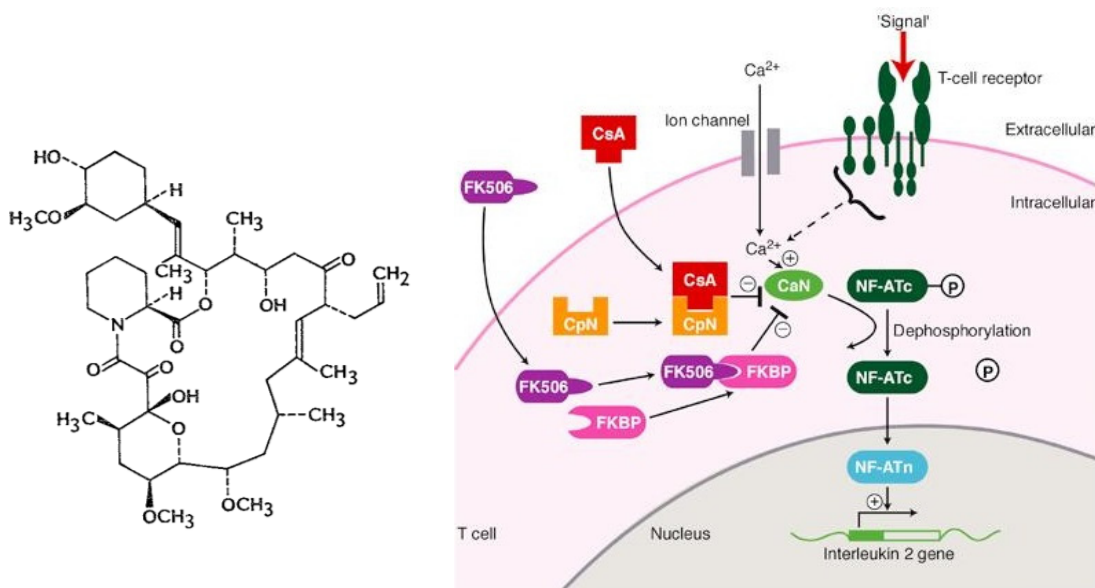


Abb. 11: Links: Chemische Strukturformel von Tacrolimus. Aus Kino et al., 1987 (183). Rechts: Schematische Darstellung der Wirkweise von Tacrolimus. FK506: Tacrolimus; FKBP: FK506-bindendes-Protein; CaN: Calcineurin-Calmodulin-Komplex; NF-

ATc: Kernfaktor aktivierter T-Zellen im Zytosol; NF-ATn: Kernfaktor aktivierter T-Zellen im Nukleus; P: Phospho-Gruppe; CsA: Cyclosporin A. Aus Stepkowski, 2000 (185).

1.4.2 Wirkmechanismus

Tacrolimus fungiert – wie alle Calcineurininhibitoren – über eine Blockade des intrazellulären Calcineurin-Calmodulin-Komplexes der T-Zelle (Abb. 11) (185, 190, 191). Hierbei bindet zunächst Tacrolimus an das intrazelluläre FK506-bindende-Protein (FKBP), wodurch der zuvor genannte Komplex inhibiert wird (185). Hierdurch wird die kalziumabhängige Phosphorylierung des Kernfaktors aktivierter T-Zellen (NFAT) verhindert, was eine verminderte, nukleare Transkription und Expression von Interleukin-2 (IL-2) und dessen Rezeptor zur Folge hat (185, 186, 190, 192, 193). Somit gelingt eine effiziente $CD4^{+}$ - und $CD8^{+}$ -T-Zell-Inaktivierung, da beide IL-2 zur Aktivierung benötigen (190, 194).

Die T-Zell-Inaktivierung stellt daher den zentralen, immunsuppressiven Mechanismus einer Tacrolimus-Therapie dar, da die entscheidende, proliferative Lymphozytenantwort auf Alloantigen-Stimulation somit potent unterbunden wird (186, 190, 195). Hierdurch werden z.B. T-Zell-abhängige Abstoßungsreaktionen vermieden (187, 194, 196-199). $CD4^{+}$ -T-Zellen sind unter physiologischen und pathologischen Bedingungen auch in der Lage, verschiedene Zytokine, Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle auszuschütten, die wiederum selbst die Neutrophilenmigration ins Gewebe medieren (vgl. 1.2) (31). Hierdurch sind T-Zellen auch für Entzündungsreaktionen, unabhängig von Abstoßungsreaktionen, des Körpers von Relevanz (200-203). Durch die Inaktivierung der T-Zellen und der damit verbundenen Prozesse wirkt Tacrolimus somit nicht nur immunsuppressiv, sondern auch stark anti-inflammatorisch.

1.4.3 Hepatoprotektive Effekte

Neben den beschriebenen etablierten Indikationen zum Einsatz von Tacrolimus konnten in den vergangenen Jahren zudem hepatoprotektive Effekte des Einsatzes von Tacrolimus herausgearbeitet werden. So konnte nachgewiesen werden, dass Calcineurin-Inhibitor durch Tacrolimus die durch hepatischen IRI verursachten Myokardschäden und mitochondrialen Funktionsschäden vermindern kann (204). Im Tierversuch konnten daher mehrere Arbeitsgruppen einen positiven Effekt von systemischer Tacrolimusgabe auf die zellschädigenden Auswirkungen und das Organ- und Tierüberleben nach Kalt- und Warmischämie zeigen (205-209). Zu diesem Zeitpunkt schrieb man die protektiven Attribute des Tacrolimus am ehesten seiner antientzündlichen Wirkung zu, wie beispielsweise der verminderten Zytokinausschüttung und der unterexprimierten Neutrophileninfiltration (206, 207, 210). Diese

calcineurininhibitor-bedingt verminderte Neutrophileninfiltration führt zu deutlich geringer ausgeprägter, inflammatorischer Gewebsschädigung und verbesserter Mikrozirkulation (208, 211, 212) (vgl.1.2). Zudem wurde lange Zeit eine hepatotrophe Wirkung von Calcineurininhibitor-Therapien für den positiven Effekt auf postischämisch geschädigte Lebern diskutiert (209, 213-215). In Lebertransplantationsexperimenten bei Ratten konnte ferner gezeigt werden, dass Lebern, die unmittelbar vor der Transplantation mit Tacrolimus gespült wurden, ebenfalls deutlich weniger IRI aufwiesen als die Kontrollgruppe (216). In diesen Versuchsgruppen konnte ein gesteigerter Glutathionmetabolismus nachgewiesen werden, wenngleich die genauen Signalkaskaden unklar waren (216). Zuvor konnten ähnliche, positive Auswirkungen einer Tacrolimusspülung von explantierten Lebern auch beim Menschen festgestellt werden (217).

2. Fragestellung

In Anbetracht des dargestellten, derzeitigen Stellenwertes der Lebertransplantation, sowie der großen, resezierenden Leberchirurgie, nimmt das Erforschen relevanter Faktoren, die das Organ- und Patientenüberleben beeinträchtigen können, eine zentrale Rolle in der aktuellen, chirurgischen Forschung ein. Der hepatische Ischämie-Reperfusionsschaden stellt hierbei eine zentrale, wenngleich unvermeidliche Komplikation dar, die es in diesem Zusammenhang besser zu verstehen gilt, um zukünftig weitere potentielle Therapieansätze erarbeiten und nutzen zu können. Die Glutathion-Peroxidase-4-abhängige Signalkaskade, deren Relevanz bereits in diversen extrahepatischen Systemen nachgewiesen werden konnte, könnte in diesem Zusammenhang als vielversprechender Ansatz dienen. Ferner konnte Tacrolimus, eines der am häufigsten verschriebenen Immunsuppressiva Deutschlands, in früheren Studien als protektiv in Bezug auf den hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden beschrieben werden, wobei die genauen Mechanismen unklar blieben, jedoch stets ein Zusammenhang mit der Glutathionhämose vermutet wurde.

Daher war das Ziel der Studie, den Stellenwert der Glutathion-Peroxidase-4-abhängigen Signalkaskade im System des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens zu erörtern und weitere Einblicke in die Wirkweise derselbigen zu erlangen. Konkret sollten folgende Fragen erörtert werden:

- Lassen sich die Auswirkungen des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens durch Inhibition der 12/15-Lipoxygenase, eines der Glutathion-Peroxidase-4 antagonistisch wirkenden Enzyms, vermindern?
- Lässt sich ein potentiell protektiver Effekt der 12/15-Lipoxygenase-Inhibition durch die Modulation des Glutathionmetabolismus erklären?
- Kann somit eine Relevanz des Glutathionmetabolismus, vornehmlich der Glutathion-Peroxidase-4, in der Entstehung des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens postuliert werden?
- Welche Mediatoren werden von der potentiellen Modulation der Glutathionhämose beeinflusst und können somit zur Ausbildung des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens beitragen?

- Besitzt Tacrolimus eine endogene Wirkung auf den Glutathionmetabolismus und die beschriebenen Signalkaskaden? Lassen sich somit zusätzliche Erkenntnisse über die Wirkweisen eines etablierten Medikaments erlangen?
- Welche zusätzlichen, potentiell toxischen Effekte können die verabreichten Reagenzien im Organismus auslösen?
- Lassen sich potentiell protektive Effekte der verabreichten Medikamente durch Kombination derselbigen verstärken?

Um diese Fragen adäquat beantworten zu können und möglichst realitätsnahe Ergebnisse erzielen zu können, wurde die Studie im Sinne eines In-Vivo-Experiments durchgeführt. Aufgrund der dem Menschen sehr ähnlichen Genexpression (218, 219) und Physiologie wurde sich in diesem Zusammenhang für ein Mausmodell entschieden. Das Modell, sowie die verschiedenen Analyse- und Auswertverfahren sollen im Folgenden eingehend erläutert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche C57BL/6-Mäuse aus der Tierzuchtanstalt in Sulzfeld der US-amerikanischen Firma „Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH“. Die Versuchstiere waren zum Zeitpunkt der Operation allesamt 8 – 10 Wochen alt mit einem Körpergewicht von ca. 25 Gramm. Während der Haltung im Institut für Chirurgische Forschung wurde auf kontinuierlichen, käfigständigen Zugang zu standardisiertem Trockenfutter und frischem Wasser geachtet. Sämtliche Experimente wurden in Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz und den Richtlinien der Regierung von Oberbayern durchgeführt. Die hier beschriebenen Tierversuche wurden nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes von der Regierung von Oberbayern unter der Antragsnummer 55.2.1.54-2532-100-11 genehmigt. Nach Beendigung eines Tierversuchs wurden die verstorbenen Versuchstiere gemäß hausinternem Verfahren des Instituts für Chirurgische Forschung zunächst einer unverzüglichen Kühlung und folglich der Kremierung zugeführt.

3.2 Modell

3.2.1 Verwendete Reagenzien und Operationsinstrumentarium

Reagenzien	Hersteller
Isopropanol 70%	Apotheke des Klinikums der Universität München, München (D)
Hautantiseptikum kodan [®] Tinktur forte farblos	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt (D)
Isotone Natriumchloridlösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Heparin-Natrium Braun 25.000 I.E./5 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Midazolam 1mg/ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Medetomidinhydrochlorid 1mg/ml	Orion Corporation, Espoo (FIN)
Fentanyl 0,1mg/2ml	Janssen-Cilag GmbH, Neuss (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Baicalein	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Tacrolimus (PROGRAF [®])	Astellas Pharma GmbH, München (D)
Flüssiger Stickstoff	Linde AG, München (D)
Formaldehyd 4% (Formalin)	Apotheke des Klinikums der Universität München, München (D)
Ethanol in einer Konzentration von 70%, 80%, 90% und 100%	Apotheke des Klinikums der Universität München, München (D)

Xylol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Paraffinwachs (Tissue-Tek®)	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen (D)

Tab. 1: Tabellarische Darstellung der für den operativen Teil und die Probenasservierung des Tierversuchs verwendeten Reagenzien mitsamt Herstellerangaben.

Operationsinstrumente & -zubehör	Hersteller
Operationstisch mit unterliegender Wärmeplatte	Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Rosdorf (D)
Einmalspritze (1 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Einmalkanüle (25 G)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Chirurgische Schere	Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen (D)
Mikroschere	S&T AG, Neuhausen (CH)
Operationsmikroskop	Carl Zeiss AG, Jena (D)
Sterile Kompressen	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf (D)
Wattestäbchen	dm-drogerie markt GmbH & Co. KG, Karlsruhe (D)
Bipolare Pinzette mit Elektromodul	Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen (D)
Chirurgische Mikropinzette	S&T AG, Neuhausen (CH)
Anatomische Mikropinzette	S&T AG, Neuhausen (CH)
Gefäßdilator	S&T AG, Neuhausen (CH)
Metallhaken	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Fine-Bore Polyethylene Katheterschlauch (Innendurchmesser 0,28mm)	Smiths Medical International Ltd., Ashford (UK)
Geflochtene Ligatur 4-0	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt (D)
Mikroclip/-gefäßklemme mitsamt Klemmenanlegepinzette	S&T AG, Neuhausen (CH)
Druckwandler (P23 ID)	Gulton Statham Inc., Costa Mesa (USA)
Elektromanometer (Press. Ampl. 863 E154E)	Siemens Medizintechnik, München (D)
Serum-Mikro-Probengefäß mit Gerinnungsaktivator, 1,3ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht (D)
Pipettierhilfen und Pipettenspitzen in verschiedenen Größen	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Reaktionsgefäße in verschiedenen Größen	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Einmalskalpell	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Wärmeschrank	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach (D)
Paraffinausgießkonsole (Tissue-Tek®)	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen (D)
Paraffinausgießformen (Tissue-Tek®)	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen (D)
Paraffinkühlplatte (Tissue-Tek®)	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen (D)
Paraffineinbettkassette (Tissue-Tek®)	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen (D)

Tab. 2: Tabellarische Darstellung der für den operativen Teil und die Probenasservierung des Tierversuchs verwendeten Operations- und Verarbeitungsinstrumente, sowie benötigtes Zubehör, jeweils mitsamt Herstellerangaben.

3.2.1.1 DMSO (Dimethylsulfoxid)

Da es sich bei Baicalein um einen Feststoff handelt, der primär nicht wasserlöslich ist, bedarf es eines polaren Lösungsmittels als Trägerstoff, um eine Aufnahme von Baicalein in den Organismus des Versuchstieres zu gewährleisten. Entsprechend der Herstellerangaben von Baicalein werden Dimethylsulfoxid (DMSO; Abb. 12) und Aceton als Lösungsmittel für Baicalein empfohlen (181). Darüber hinaus stellen diverse Alkohole ebenfalls etablierte und gut untersuchte Lösungsmittel für Baicalein dar (220). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die intraperitoneale Applikation von Alkohol selbst mit einer verminderten Gpx-Aktivität korreliert und somit zu vermehrtem oxidativen Schaden führen kann (221). Da Alkohole somit potentiell mit den Signalkaskaden interagieren, die es in dieser Studie zu untersuchen galt, kam in dem beschriebenen Experiment das in der Forschung etablierte DMSO als Trägerstoff für Baicalein zur Anwendung.

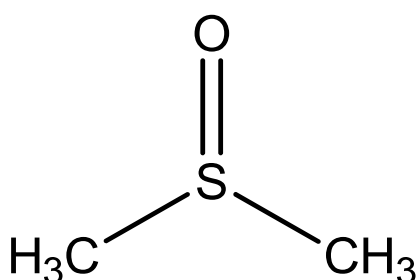


Abb. 12: Links: Chemische Strukturformel von Dimethylsulfoxid (DMSO). Rechts: Fotografie von Alexander Michailowitsch Saizew, dem Entdecker des DMSO (222).

DMSO ist ein aprotisches Lösungsmittel und wurde im Jahre 1867 vom russischen Chemiker Alexander Michailowitsch Saizew (Abb. 12) als Produkt der Oxidation von Dimethylsulfid erstbeschrieben (223). Schon kurz nach dessen Entdeckung machte man sich die lösenden Eigenschaften des DMSO für hydrophile Substanzen und dessen eigene Löslichkeit in Wasser zu Nutze (224). Die Eigenschaften als membranpenetrierendes Vehikel nutzte man zunächst für die perkutane Medikamentenaufnahme, beispielsweise von Insulin, Steroiden oder Heparin (225-227). In den Folgejahren gelang es mehreren Studien, DMSO selbst zunehmend häufiger anti-inflammatorische Effekte zuzuschreiben (224, 228-230). Als eine viel zitierte Genese hierfür wird die antioxidative Wirkung von DMSO als Radikalfänger genannt (231-233), welche auch den postulierten anti-ischämischen Effekten von DMSO im kardiovaskulä-

ren und zentralnervösen System zu Grunde liegt (234, 235). In den vergangenen Jahren ist zunehmend von hepatoprotektiven Effekten – auch in postischämischen Modellen – berichtet worden, die von DMSO ausgelöst worden seien (236, 237). Daher diente DMSO in dieser Studie nicht nur als Trägermolekül, sondern sollte ferner selbst in Bezug auf dessen Wirkung auf den hepatischen IRI mituntersucht werden.

3.2.2 Anästhesie

Im Rahmen der Narkosevorbereitung wurde auf ein keimarmes Operationsumfeld, sowie einen stressfreien Transport der Versuchstiere zur endgültigen Operationsstätte geachtet. Der Operationstisch wurde mit Hilfe der unterliegenden Wärmeplatte konstant auf 37°C erwärmt. Die Anästhesie im durchgeführten Tierversuch wurde mit einer für Mausexperimente etablierten Intraperitonealnarkose mit dem Benzodiazepin Midazolam, dem α_2 -Adrenorezeptoragonisten Medetomidin und dem Opioid Fentanyl durchgeführt (238, 239). Entsprechend des hausinternen und veröffentlichter Tierversuchsprotokolle wurde die Narkose vor Beginn eines jeden Versuches neu im Verhältnis 1 (Fentanyl) : 10 (Medetomidin) : 100 (Midazolam) angemischt. So erhielt jedes Tier zur Narkoseeinleitung 500µg/kg Körpergewicht Medetomidin, 5mg/kg Körpergewicht Midazolam und 50µg/kg Körpergewicht Fentanyl. Die Narkoseeinleitung erfolgte nach laborüblichem Standard durch intraperitoneale Applikation des Anästhesiegemisches in den linken Unterbauch. Die erzielte Narkosetiefe wurde durch Überprüfen eines negativen Lid- und Umdrehreflexes, sowie einer negativen Schmerzantwort bei erhaltenen Atemexkursionen festgestellt.

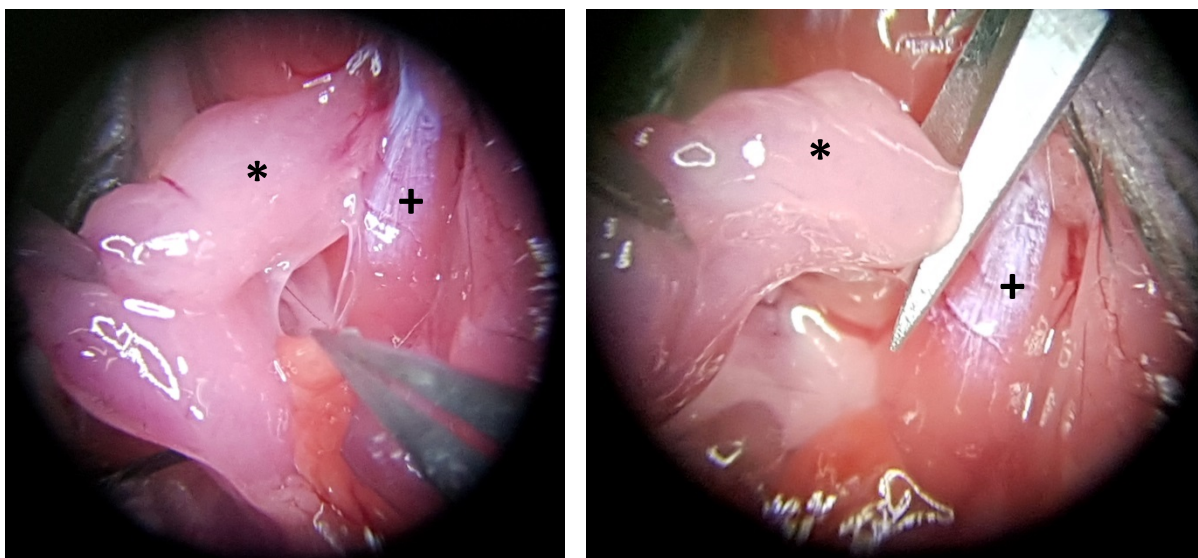


Abb. 13: Fotografische Darstellung verschiedener mikrochirurgischer Schritte zur Realisierung der anästhesiologischen Überwachung im Rahmen der Tierversuchs. Links: Stumpfe Freipräparation der rechten Glandula submandibularis (*) aus

dem umliegenden Bindegewebe. Rechts: Scharfes Absetzen der rechten Glandula submandibularis (*) nach vorheriger Elektrokoagulation des versorgenden Gefäßstiels. + = M. sternocleidomastoideus.

Zur Überwachung von Narkose und intraoperativer Kreislauffunktionen während des gesamten Experiments erfolgte eine kontinuierliche, intraarterielle Überwachung der hämodynamischen Parameter (vgl. 3.3.1). Hierzu erfolgte die Positionierung des Versuchstieres in Rückenlage auf dem erwärmten Operationstisch unter dem Operationsmikroskop unter leichter Überstreckung des Kopfes zur Erleichterung der bei Nagetieren obligaten Nasenatmung, sowie abduzierender Auslagerung der Extremitäten. Im weiteren Verlauf wurde die Rasur und Hautdesinfektion des Versuchstieres im ventralen Abdominal-, Thorax- und Halsbereich durchgeführt. Ferner erfolgte eine oberflächliche, quer verlaufende Hautinzision von der Fossa jugularis zum rechts-lateralen Rand der Mandibula mit der Schere. Das sich nun aufspannende Platysma wurde stumpf mit zwei Pinzetten eröffnet und disseziert. Hierdurch wurde die rechtsseitige Glandula submandibularis freigelegt, welche im weiteren Schritt reseziert wurde (Abb. 13). Somit konnten der M. sternocleidomastoideus und der M. omohyoideus im nächsten Schritt ebenfalls jeweils ansatz- und ursprungsnah elektrokoaguiert und durchtrennt werden. Durch dieses Manöver kam die Arteria carotis communis (ACC) dextra über eine weite Strecke gut zum Vorschein und konnte stumpf vom umliegenden lymphatischen Gewebe unter Schonung des Nervus vagus freipräpariert werden (Abb. 14).

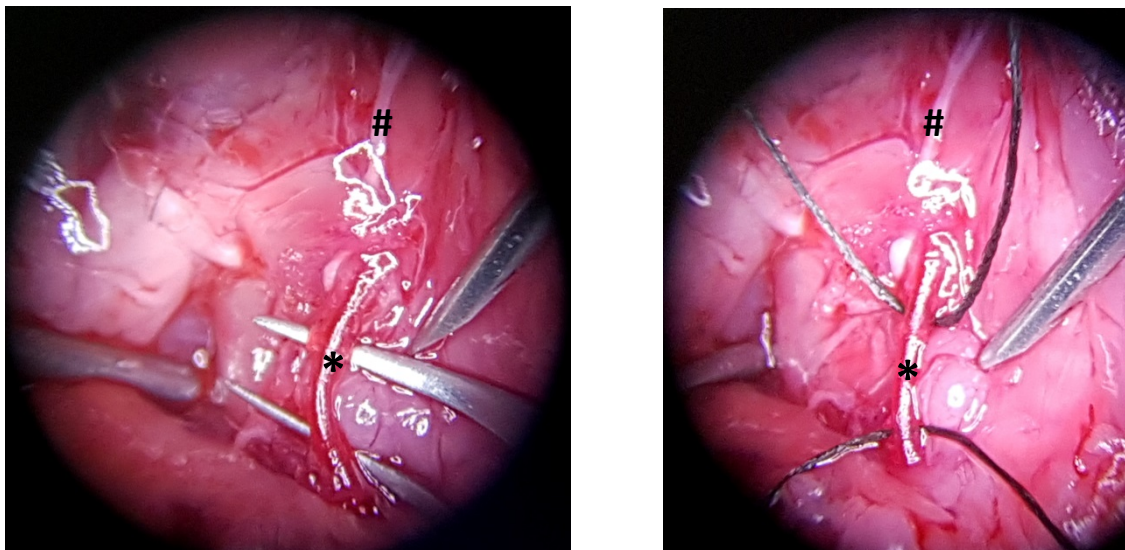


Abb. 14: Fotografische Darstellung verschiedener mikrochirurgischer Schritte zur Realisierung der anästhesiologischen Überwachung im Rahmen der Tierversuchs. Links: Stumpfe Abpräparation der A. carotis communis dextra (*) aus dem umliegenden lymphatischen Gewebe und vom N. vagus (#). Rechts: Vorlegen der kranialen und kaudalen Ligatur um die rechte A. carotis communis (*) vor Einführen des Katheters.

Die ACC wurde nun nach distal mit einer Ligatur ligiert und nach proximal mit einer Gefäßklemme temporär verschlossen. Nach proximal wurde ebenfalls eine Ligatur vorgelegt (Abb. 14). Nun erfolgte die oberflächliche fischmaulartige Eröffnung des Gefäßlumens mit der Mikroschere, in welches der zuvor mit Heparin-Kochsalzlösung gespülte Polyethylen-Katheter mit Hilfe des Gefäßdilators eingeführt wurde. Hiernach wurde die proximal applizierte Gefäßklemme geöffnet und der Katheter mit der vorgelegten Ligatur im Gefäßlumen fixiert (Abb. 15). Der arterielle Mitteldruck, wie auch die Herzfrequenz konnten somit mit dem Elektromanometer, welches über den Druckwandler mit dem arteriellen Katheter verbunden war, kontinuierlich gemessen und ausgewertet.

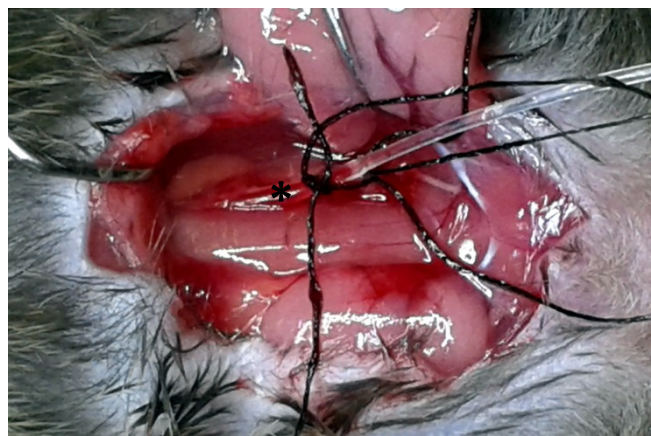


Abb. 15: Fotografische Darstellung verschiedener anästhesiologischer Schritte im Rahmen der Tierversuchs. Situs der A. carotis communis rechts (*) mit eingebrachtem arteriellen Katheter.

3.2.3 Operationsablauf

3.2.3.1 Induktion von Ischämie und Reperfusion

Nach Einleitung der Narkose, Etablierung einer intraarteriellen, hämodynamischen Überwachung und gegebenenfalls vollzogener medikamentöser Vorbehandlung (vgl. Kapitel 3.5) konnte zunächst eine oberflächliche Medianlaparotomie mit der chirurgischen Schere von der Symphysis pubica bis zum Sternum durchgeführt werden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass zunächst lediglich die Haut eröffnet wurde. Daraufhin erfolgte die mediane Längseröffnung von Abdominalfaszie und Peritoneum unter penibler Schonung intraabdominell befindlicher Organe und Gefäßstrukturen. Nun wurde der Großteil des mobilen Darpakets des Versuchstieres mit Hilfe von Wattestäbchen nach ex situ, lateral der linken Körperhälfte verlagert, um eine bessere Übersicht über die Leber und ihre versorgenden Strukturen zu erhalten. Zum Schutz des Darmes wurde dieser lediglich mit Wattestäbchen stumpf mobilisiert und in eine feuchte, mit Kochsalzlösung getränkte Kompresse gewickelt.

Somit konnten übermäßige Flüssigkeits- und Temperaturverluste über den Darm vermieden werden. Zudem wurde der Darm auf Zeichen der apperenten Distension hin untersucht, um auszuschließen, dass die zuvor intraperitoneal zu applizierende Medikation unwillkürlich intraluminal verabreicht wurde.

Die Leber der Maus ist in drei Lappen und insgesamt sechs Segmente unterteilt. Diese werden in der Mausanatomie im Uhrzeigersinn als rechtes posteriores Segment (RPS), rechtes mittleres Segment (RMS), rechtes anteriores Segment (RAS), linkes anteriores Segment (LAS), linkes posteriores Segment (LPS) und omentales Segment (OS) bezeichnet (240) (Abb. 16A). In der hier beschriebenen Studie wurde eine Ischämie des RAS, LAS und LPS erzeugt, was je nach Literaturangabe einem der Ischämie zugeführten Leberanteil von 65 – 70% entspricht (240-242). Die folgenden Präparationsschritte wurden entsprechend der etablierten Protokolle der Arbeitsgruppen um Hori (240) und Mitchell (243) durchgeführt.

Nach der vorbeschriebenen Exposition der Leber wurde zur besseren Mobilisation der Leberlappen, in welchen ein Ischämie-Reperfusionsschaden induziert werden sollte, zunächst das Ligamentum falciforme bis auf die Ebene der suprahepatischen Vena cava inferior mit der Mikroschere scharf durchtrennt. In der weiteren Folge erfolgte die scharfe Dissektion der membranös-ligamentären Strukturen zwischen LPS und dem Zwerchfell, sowie zwischen LPS und OS (Abb. 16B). Darüber hinaus wurde die Membran, die zwischen LAS und LPS einerseits und Leberhilus und Gastroduodenaltrakt andererseits verläuft, ebenfalls scharf durchtrennt. Dies hatte zur Folge, dass sich nun RAS, LAS und LPS komplett mobil präsentierten und lediglich über ihren gemeinsamen, zum Leberhilus ziehenden Pedikel fixiert waren (Abb. 16C). Dieser gemeinsame Pedikel, in welchem die jeweilig versorgenden Pfortader-, Leberarterien- und Gallengangsäste der genannten Lebersegmente verlaufen, wurde im nächsten Operationsschritt mit einer Mikrogefäßklemme versorgt und abgeklemmt (Abb. 16D). Hiernach war eine rasche Entfärbung zu blass-rosa von RAS, LAS und LPS als Zeichen der Ischämieinduktion zu verzeichnen (Abb. 16E). Parallel wurde darauf geachtet, dass es zu keiner Entfärbung der anderen Lebersegmente gekommen war, um eine Fehlpositionierung der Gefäßklemme auszuschließen. Die Ischämiezeit betrug 60 Minuten, in welchen das Abdomen intermittierend mit warmer Kochsalzlösung versorgt wurde und mit Hilfe von Klemmen provisorisch verschlossen wurde, um eine adäquate, peritoneale Flüssigkeitssubstitution auf der einen Seite aufrechtzuerhalten und eine übermäßige Flüssigkeitsverdunstung

über das Abdomen auf der anderen Seite zu vermeiden. Zuvor wurde das externalisierte Darmpaket naturgemäß wieder nach intraabdominell replaziert.

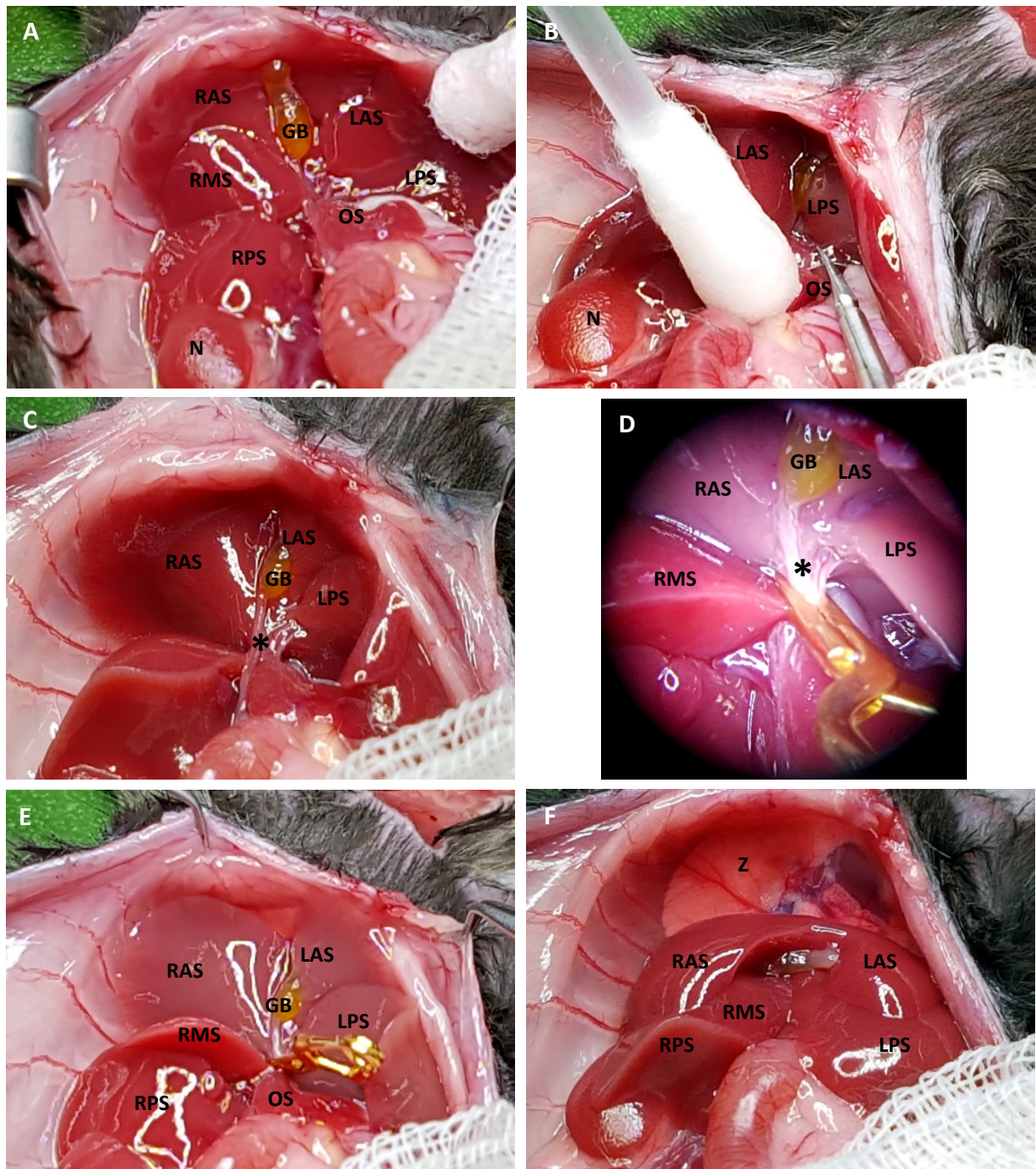


Abb. 16: Fotografische Darstellung verschiedener operativer Schritte des Tierversuchs. A: Lebersitus nach Externalisierung des Darmpakets. RPS = rechtes posteriores Segment; RMS = rechtes mittleres Segment; RAS = rechtes anteriores Segment; LAS = linkes anteriores Segment; LPS = linkes posteriores Segment; OS = omentales Segment; N= rechte Niere; GB = Gallenblase; Z = Zwerchfell. B: Präparation und Dissektion des Ligaments zwischen LPS und OS. C: Darstellung des gemeinsamen Pedikels (*) von RAS, LAS und LPS nach entsprechender Freipräparation. D: Applikation eines Mikroclips auf den gemeinsamen Pedikel (*) von RAS, LAS und LPS. E: Lebersitus nach Ischämie-Induktion. RAS, LAS und LPS präsentieren sich im Vergleich zu den anderen Lebersegmenten deutlich entfärbt. F: Dunkelrotfärbung von RAS, LAS und LPS nach Entfernung des Mikroclips in der Reperusionsphase.

Nach 60-minütiger Ischämiezeit und konsekutiver Re-Externalisierung des Darmpakets wurde die applizierte Gefäßklemme vom gemeinsamen Pedikel des RAS, LAS und LPS entfernt, woraufhin eine zügige, homogene Dunkelrotfärbung der betroffenen Lebersegmente festzustellen war (Abb. 16F). Die nun folgende Reperfusionszeit betrug 90 Minuten, in welchen nach Replatzierung des Darms erneut intraperitoneale Flüssigkeitssubstitution mit warmer Kochsalzlösung und ein provisorischer Abdominalverschluss vollzogen wurden. Nach abgelaufener Reperfusionszeit erfolgte die Exsanguinierung und Probenasservation.

3.2.3.2 Scheinoperation

In der Kontrollgruppe zu der dargestellten Versuchsreihe wurde eine Scheinoperation ohne Induktion eines postischämischen Leberschadens durchgeführt. Hierzu erfolgten Narkosevorbereitung, Narkosedurchführung und intraarterielle hämodynamische Überwachung analog zur Experimentalgruppe. Ebenfalls wurde die vorbeschriebene Operation bis zur Präparation der Leber identisch durchgeführt. Die ligamentär-membranösen Strukturen um RAS, LAS und LPS wurden wie in 3.2.3.1 dargestellt einschließlich des Ligamentum falciforme scharf durchtrennt, um eine stumpfe Mobilisation der Leber zu ermöglichen. Nach diesem Schritt wurden die präparatorischen Schritte beendet. Es wurde keine Intervention im Bereich der hilären Strukturen oder des Leberpedikels durchgeführt. Das Darmpaket wurde nun nach intraabdominell replaziert und für eine ausreichende intraperitoneale Flüssigkeitszufuhr mit warmer Kochsalzlösung gesorgt. Auch in der scheinoperierten Gruppe wurde ein provisorischer Abdominalverschluss mit einer Klemme vollzogen. Um eine zur Experimentalgruppe vergleichbare Operationszeit zu erzielen, wurde eine Operationspause von 150 Minuten eingehalten.

3.2.4 Probenasservation

Zum Ende des operativen Eingriffes wurde mit der Asservation der für die weiteren Analysen benötigten Proben begonnen. Hierzu erfolgte zunächst die Exsanguinierung des Versuchstieres, um einerseits eine adäquat zu verarbeitende Menge Blut für die Serumprobe zu gewinnen und andererseits eine etablierte Form der Euthanasie einzuleiten (244).

Nach Ablauf des operativen Ablaufs wurde das Darmpaket erneut stumpf externalisiert, um die infrahepatische Vena cava inferior freizulegen. Diese wurde im Folgenden mit einer 25G-Kanüle etwas kranial der Bifurkation punktiert und durch sanfte Aspiration so lange exsanguiniert, bis kein relevanter Blutrückstrom mehr festzustellen war. Das gewonnene Blut

wurde nun in ein Serum-Probengefäß mit Gerinnungsaktivator überführt. Im weiteren postoperativen Verlauf konnte das Blut entsprechend der Herstellerangaben bei 10.000 x g für 5 Minuten zentrifugiert und das Serum abpipettiert werden (245). Das Serum wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren gelagert.

Als nächster Schritt wurde die Explantation der für diesen Versuchsaufbau relevanten Lebersegmente durchgeführt. Aufgrund der zuvor durchgeführten Freipräparation von RAS, LAS und LPS von ligamentären Strukturen war lediglich die Durchtrennung des gemeinsamen Pedikels mit der Mikroschere von Nöten, um die Lebersegmente von den hilären Strukturen zu lösen. Durch die Durchtrennung der dorsal gelegenen Vena cava inferior ließen sich die Lebersegmente schlussendlich vollständig explantieren. Nun erfolgte die Trennung der Lebersegmente mit dem Skalpell. Das LPS wurde nun in ein mit 4%igen Formalin gefülltes Probengefäß überführt. Das LAS und RAS wurden in ein stickstoffsicheres Probengefäß eingebracht, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Das in Formalin fixierte LPS wurde zur weiteren analytischen Aufarbeitung entsprechend des haus-eigenen Protokolls in Paraffin gegossen. Zuvor bedurfte es hierzu der gewebeschonenden Entwässerung des Gewebes mit Hilfe des etablierten, laboratorischen Prozesses der aufsteigenden Alkoholreihe. Nach Ausguss, Abkühlung und Aushärtung des Paraffinblocks auf der Kühlplatte konnte dieser bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert werden

3.3 Analyseverfahren

3.3.1 Makrohämodynamik

Während des gesamten operativen Ablaufs wurden die Parameter der Makrohämodynamik überwacht (vgl. 3.2.2). Hierzu wurde das mechanische Signal des Blutflusses über den gespülten, luftfreien und in die rechte Arteria carotis communis eingebrachten Katheter an einen Druckwandler weitergeleitet. Dieser ermöglichte die Umwandlung des mechanischen in ein elektrisches Impedanzsignal, welches wiederum selbst zur Auswertung an ein Elektromanometer fortgeleitet wurde. Somit gelang die kontinuierliche, graphische Darstellung der Blutdruckkurven mit automatischer Berechnung von arteriellem Mitteldruck und Herzfrequenz. Die Dokumentation dieser Daten erfolgte im fünfminütigen Intervall. Neben der versuchsgruppenspezifischen Auswertung der hämodynamischen Parameter konnte somit eine

problemlose, fortwährende Überwachung der Narkosetiefe, welche gegebenenfalls medikamentös angepasst werden konnte, gewährleistet werden (vgl. 3.2.2).

3.3.2 TUNEL-Assay

Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	Hersteller
InSitu Cell Death Detection Kit, Fluorescein (50 Tests)	Hoffmann-La Roche AG, Basel (CH)
Xylol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Ethanol in einer Konzentration von 100%, 96%, 80% und 70%	Apotheke des Klinikums der Universität München, München (D)
Destilliertes Wasser	Apotheke des Klinikums der Universität München, München (D)
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Proteinase K, 5ml	Hoffmann-La Roche AG, Basel (CH)
DNAseI, grade I	Hoffmann-La Roche AG, Basel (CH)
VECTASHIELD® Hard Set Mounting Medium Hard with DAPI H-1500	Vector Laboratories Inc., Burlingame (USA)
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt (D)
pH-Kontroll-Lösungen mit pH = 4,00, pH = 7,00 und pH = 10,00	HANNA Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen (D)
Elektroden-Lösung	HANNA Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen (D)
Pinzette 130mm, stumpf	Mollenkopf GmbH, Stuttgart (D)
Kurzzeitmesser, 3-zeilig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Glaskasten 105x85x70	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Färbegestell 85x60x45	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Drahtbügel	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Reaktionsgefäß, 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Menzel® Deckgläser 32 x 50mm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Pipettenspitzen blau, gelb	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Feuchte Kammer	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach (D)
Pipetten in diversen Größen	Eppendorf AG, Hamburg (D)
pH-Messer	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim (D)
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen (D)
Heizplatte mit Rührfunktion	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen (D)
Fluoreszenzmikroskop mit Kameraanschluss	Carl Zeiss AG, Jena (D)

Tab. 3: Tabellarische Darstellung der für den TUNEL-Assay verwendeten Reagenzien, Verarbeitungsinstrumente und Laborbedarf mitsamt Herstellerangaben.

Um das Ausmaß des durch den hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden verursachten Zelltod ermitteln zu können, wurde die quantitative Ermittlung des Zelltodanteils im hepatischen Gewebe mittels TUNEL-Assay durchgeführt. TUNEL stellt hierbei die Abkürzung für „terminal deoxy-nucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end-labeling“ (246) dar. Diese immunhistochemische Färbemethode macht sich die Fähigkeit von TdT zu Nutze, an freie Doppelstrangenden der DNA zu binden, die vorher durch das Aufbrechen derselbigen entstanden sind (246, 247). Das Aufbrechen der DNA, beispielweise durch apoptosespezifische Endonukleasen, und das daraus resultierende Auftreten von DNA-Fragmenten und freien DNA-Enden stellt ein Charakteristikum des Zelltods, allen voran des durch Apoptose eingeleiteten Zelltods, dar (248-251). Aus dieser Erkenntnis wurde eine Technik entwickelt, solche DNA-Fragmente für eine konsekutive Analyse kenntlich zu machen und somit abgestorbene Zellen identifizieren zu können (252). Hierzu werden zumeist modifizierte Nucleotide, wie das in diesem Fall verwendete Fluorescein-dUTP, benutzt, welches in einer Reaktion, die durch TdT katalysiert wird, an die freien 3'-OH-Enden fragmentierter DNA binden kann (253). Das in dem Nucleotid-Polymer mit dUTP eingeschlossene Fluorescein ist ein Triphenylmethan-Farbstoff mit fluoreszierenden Eigenschaften (254).

Um das zu untersuchende Lebergewebe der in-situ Fluoreszenz-Färbung zugänglich zu machen, wurden aus den in Paraffin gegossenen Leberlappen Gewebeschnitte von zwei Mikrometer Dicke angefertigt. Diese wurden ferner mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Es folgte eine Inkubation mit Proteinase K, um ein Trennen der Zellkerne aus sämtlichen Proteinverbindungen zu ermöglichen und somit die freien DNA-Enden in den Zellkernen einer Bindung mit Fluorescein-dUTP zugänglich zu machen (252). Nun konnte die TUNEL-Reaktion gestartet werden, indem die TdT- und Fluorescein-dUTP-haltige Lösungen auf die Gewebeschnitte aufgebracht und inkubiert wurden. Nach Auswaschen der TUNEL-Lösungen mit PBS war ein Eindecken der Gewebeschnitte mit einem DAPI-haltigen Mounting Medium möglich. Als Positivkontrolle wurde Lebergewebe verwendet, bei welchem zuvor sämtliche DNA mit Hilfe von DNase I gespalten wurde und somit in jedem Zellkern ein TUNEL-positives Signal erzeugt wurde (Abb. 17A). Die Negativkontrolle stellte Gewebe dar, welches lediglich mit Fluorescein-dUTP, jedoch nicht mit TdT verarbeitet wurde. Durch den fehlenden Katalysator TdT war somit ein Binden von Fluorescein-dUTP an die freien DNA-Enden nicht möglich (Abb. 17B).

Die Analyse der auf beschriebene Weise angefertigten TUNEL-Assays erfolgte mit Hilfe des etablierten Verfahrens der Fluoreszenzmikroskopie bei einer Exzitationswellenlänge von 450-500 Nanometern, sowie einer Emissionswellenlänge von 515-565 Nanometern zur Detektion von Fluorescein (253, 255). Das Eindeckmedium enthielt zudem DAPI, welches ebenfalls einen Fluoreszenzfarbstoff darstellt, der zuverlässig bei einer Exzitationswellenlänge von 360 Nanometern und einer Emissionswellenlänge von 460 Nanometern sämtliche Zellkern-DNA detektiert (256, 257). Somit konnte eine gleichmäßige Färbekontrolle der Gewebeschnitte gewährleistet werden (Abb. 17C), welche durch das Computerprogramm des Fluoreszenzmikroskops mit der Fluorescein-Detektion kombiniert werden konnte (Abb. 17D). Sämtliche Gewebeschnitte wurden bei 10-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Pro Gewebeschnitt wurden 10 Bilder aus unterschiedlichen Arealen angefertigt, um somit den gesamten Gewebeschnitt mittels optischer Flächenfraktionsanalyse auswerten zu können (vgl. 3.4.2).

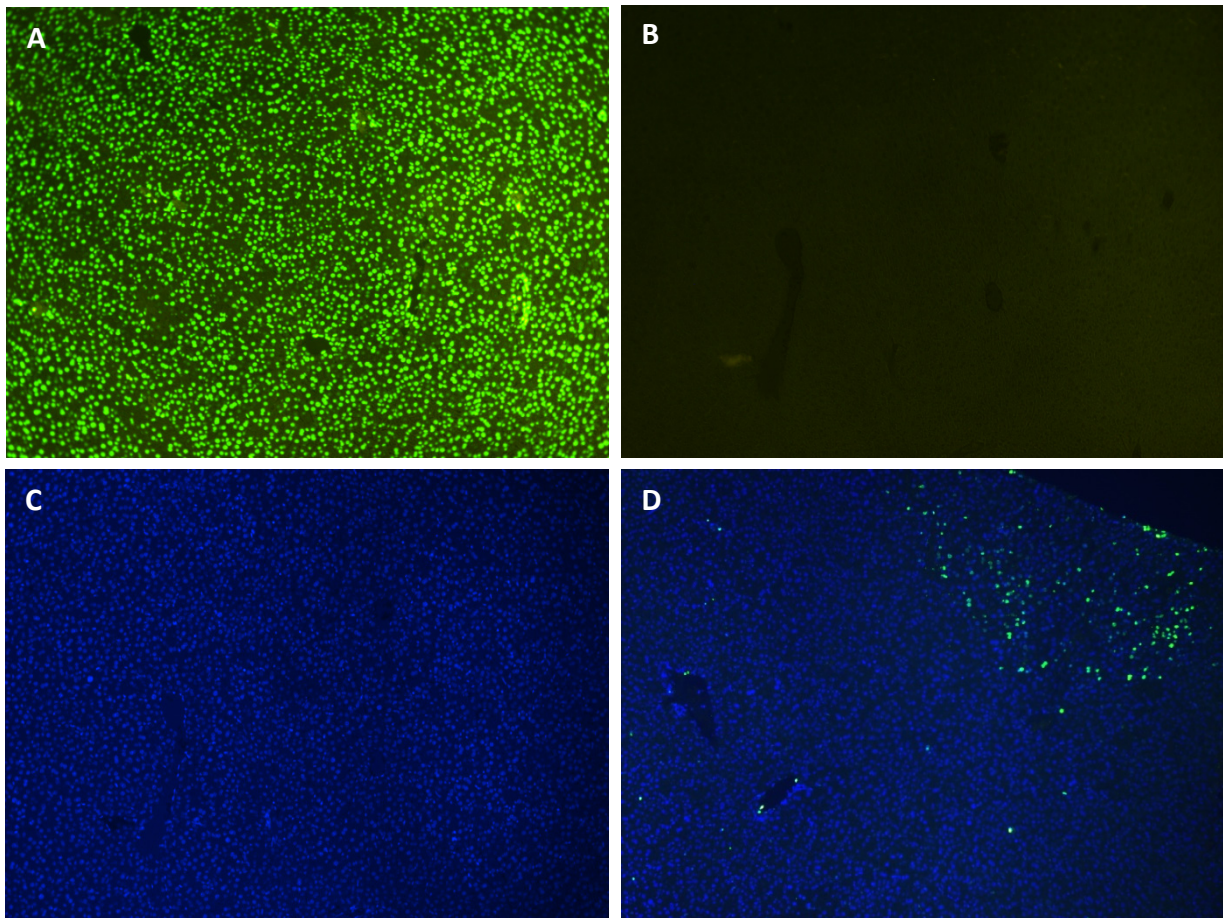


Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Lebergewebeschnitte bei 10x-Vergrößerung. A: Positivkontrolle des TUNEL-Assays mit Fluorescein bei einer Exzitationswellenlänge von 450nm, sowie einer Detektionswellenlänge von 515nm; Sämtliche Zellkerne sind grün fluoreszenzmarkiert als Zeichen der ubiquitären DNA-Spaltung. B: Negativkontrolle des TUNEL-Assays mit Fluorescein bei einer Exzitationswellenlänge von 450nm, sowie einer Detektionswel-

lenlänge von 515nm; Keine fluoreszenzmarkierten Zellen sind nachweisbar. C: Färbekontrolle mit DAPI bei einer Exzitationswellenlänge von 360nm, sowie einer Detektionswellenlänge von 460nm; Sämtliche Zellkerne sind blau fluoreszenzmarkiert. D: Übereinander gelegte Aufnahme desselben Gewebeschnitts der DAPI-Färbekontrolle und des TUNEL-Assays mit Fluorescein; Sämtliche Zellkerne sind blau fluoreszenzmarkiert, abgestorbene Zellen grün.

3.3.3 Gewebelyse, Proteinmengenbestimmung und Western-Blot-Untersuchungen

Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	Hersteller
Nunc Nalgene™ 96 Well Plate	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Pierce™ BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Reaktionsgefäße in verschiedenen Größen	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Petrischale	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht (D)
Einmalskalpell	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Micropistillmörser	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Zellysepuffer (10x)	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main (D)
DL-Dithiothreitol-Lösung (DTT)	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Protease-Inhibitor	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Vmax Kinetic ELISA Microplate Reader	Molecular Devices, LLC, San José (USA)
Software "Softmax"	Molecular Devices, LLC, San José (USA)
Ultraschall-Homogenisator	Sartorius AG, Göttingen (D)
Pipettierhilfen und Pipettenspitzen in verschiedenen Größen	Eppendorf AG, Hamburg (D)

Tab. 4: Tabellarische Darstellung der für Gewebelyse und Proteinmengenbestimmung verwendeten Reagenzien, Verarbeitungsinstrumente und Laborbedarf mitsamt Herstellerangaben.

Die Evaluation der Zelltodmechanismen machte eine Untersuchung verschiedener proapoptotischer Proteine unabdingbar. Die Enzymquantifizierung wurde in diesem Fall mit Hilfe des etablierten Western Blot-Verfahrens im Rahmen einer Gelelektrophorese durchgeführt (258-261). Hierfür war zunächst die Aufarbeitung der postischämischen Leberlappen im Rahmen einer Gewebelyse erforderlich. Teile des bei -80°C gelagerten LAS und RAS (vgl. 3.2.4) wurden hierzu mit einem Micropistill gemörsert und mit Zellysepuffer gemischt, um eine Homogenisierung zu erreichen und ein vorzeitiges Denaturieren der im Gewebe enthaltenen Proteine zu verhindern (262). Nach Inkubation, Ultraschall-Homogenisation und Zentrifugation bei 20.000 x g konnte das fertige Lysat abpipettiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert werden.

Aufgrund der Tatsache, dass naturgemäß verschieden große Gewebestücke zur Lyse verwendet wurden, unterschieden sich die Lysate zunächst in ihrem Gesamtproteingehalt. Da

eine identische Proteinbeladung der verschiedenen Proben für eine adäquate Western Blot-Untersuchung jedoch essentiell ist (263), erfolgte im weiteren Schritt eine Proteinmengenbestimmung der einzelnen Lysate. Hierzu wurden die Probenlysate einem Bicinchoninsäure-Assay (BCA) unterzogen, der es sich zu Nutze macht, dass Proteine in alkalischem Milieu zweifach geladene Kupferionen (Cu^{2+}) zu einfach geladenem Cu^+ reduzieren (264). Dieses einfach geladene Kupferion bildet zusammen mit dem hinzugefügten BCA einen Chelatkomplex violetter Farbe, welcher direkt proportional zur Proteinmenge Licht einer Wellenlänge von 562 Nanometern absorbiert (265, 266). Durch den im ELISA-Mikroplatten-Lesegerät gemessenen Anteil an absorbiertem Licht konnte nach Bearbeitung durch die zugehörige Software der Proteingehalt im Lysat im Verhältnis zu zuvor festgelegten Standardproteinverdünnungen von Albumin bestimmt werden (265). Es wurden stets 3 Proben pro Lysat untersucht, aus deren quantifiziertem Proteingehalt ein Mittelwert für die weitere Verarbeitung gebildet wurde.

Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	Hersteller
Pipettierhilfen und Pipettenspitzen in verschiedenen Größen	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Reaktionsgefäße in verschiedenen Größen	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Primäre Antikörper gegen murine ERK1/2, Phospho-ERK1/2, Caspase-3, SAPK/JNK, Phospho-SAPK/JNK und PARP, jeweils aus Hase gewonnen	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main (D)
Sekundärer Antikörper gegen Hasen-IgG, gebunden an Meerrettichperoxidase (HRP), aus Ziege gewonnen	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main (D)
Monoklonaler Antikörper gegen murine Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), aus Hase gewonnen	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main (D)
Proteinstandard Precision + Protein Dual Color Standard (500µl)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
Röntgenkassette	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Amersham™ Hyperfilm ECL Chemilumineszenzfilm	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg (D)
Polyvinylidenfluorid (PVDF) - Membran (0,2 µm)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
Whatman™ Filterpapier	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg (D)
Trisaminomethanhydrochlorid (TRIS-HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)

Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Bovines Serumalbumin (BSA), biotinfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Pinzette mit flachen Enden	Mollenkopf GmbH, Stuttgart (D)
10 x SDS Gelelektrophorese-Puffer (Tris/Glycin/SDS)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
SuperSignal® Chemilumineszenz-Lösung	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Polysorbat-20 (Tween® 20)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg (D)
2-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Destilliertes Wasser	Apotheke des Klinikums der Universität München, München (D)
30% Acrylamid-Mix	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
1,5M TRIS (pH 8,8)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Ponceau S	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg (D)
Mini-Protean® 3 Elektrophorese-System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
PowerPac™ 300 Elektrophorese-Netzteil	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
Biometra® WT16 Wipptisch	Biometra GmbH, Göttingen (D)
SCOPIX LR 520 Röntgenentwickler	Agfa HealthCare GmbH, Bonn (D)
Mini-Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell + Schwämmchen	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
Blotter für Semi-Dry-Methode	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)

Tab. 5: Tabellarische Darstellung der für den Western-Blot verwendeten Reagenzien, Verarbeitungsinstrumente und Laborbedarf mitsamt Herstellerangaben.

Entsprechend der hausinternen Protokolle und in Anlehnung an multiple Veröffentlichungen wurden in der weiteren Folge die Western Blot-Analysen vorbereitet und durchgeführt (261, 263, 267, 268). Hierzu mussten zunächst die Proteine per Gelelektrophorese in ein Polyacrylamid-Gel eingebracht und entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. In dem hier beschriebenen Experiment wurde zunächst ein SDS-haltiges TRIS-Glycin-Gel mit 15%-igem Polyacrylamidanteil als Trenngel und ein darüber gelagertes Sammelgel mit 5%-igem Polyacrylamidanteil gegossen. Die jeweils 20 µg gesamtproteinenthaltenden Probenlysate wurden nun mit einem SDS-haltigen Gel-Auftrags-Puffer versetzt und in die Probenaussparungen des Sammelgels eingebracht. Da an den Gelen nach Herstellung und Bestückung mit Proben, Proteinstandard, Negativ- und Positivkontrollen in Gelelektrophorese-Puffer lagernd eine Spannung angelegt wurde, wurden die nun negativ geladenen Proteinen entsprechend ihrer

Molekülmasse absteigend weit zur unterhalb des Gels angebrachten Anode gezogen. Anhand des in der ersten Spalte eines jeden Gels eingebrachten Proteinstandards mit vordefinierten Proteingrößen konnten Proteine in den Lysatproben bezüglich ihrer Molekülmasse eingeschätzt werden.

Der Transfer der Proteine vom Gel auf eine Membran, welche zur späteren Immundetektion von Proteinen verwendet wurde, erfolgte mittels Semi-Dry-Blotter-Methode. Hierbei wurde erneut ein elektrisches Spannungsfeld zwischen Gel und der Polyvinylidenfluorid (PVDF) – Membran erzeugt, auf welche die Proteine übertragen werden sollten. Die durch SDS negativ geladenen Proteine folgten erneut dem natürlichen Weg in Richtung der angelegten Anode und damit auf die PVDF-Membran, welche in Transferpuffer getränkt wurde, um einerseits ein Milieu für den Proteintransfer aufrecht zu erhalten und andererseits die Hydrophobie der Membranoberfläche zu reduzieren (269). Der Erfolg des Proteintransfers wurde umgehend mit einer reversiblen Proteinfärbung mit Ponceau S getestet (270).

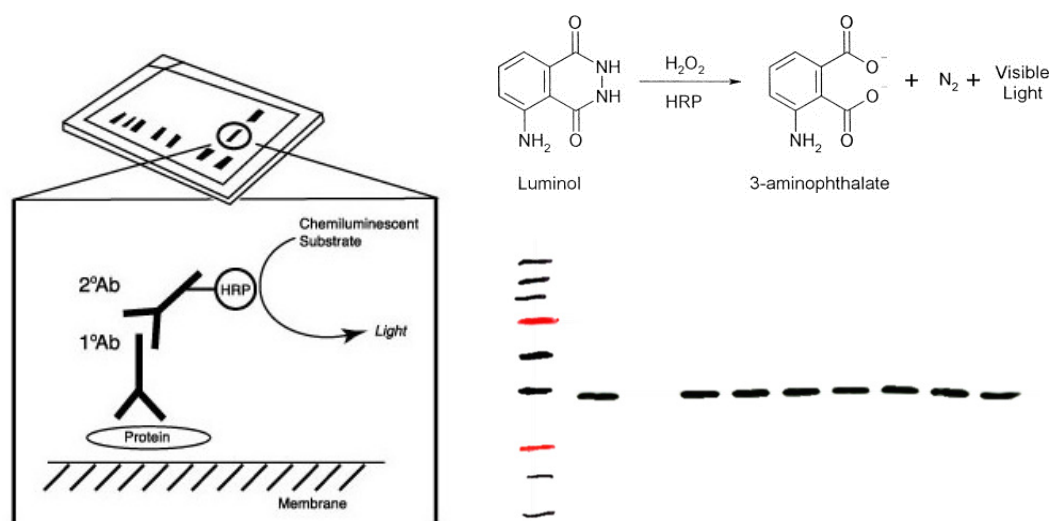


Abb. 18: Links: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Immundetektion eines Proteins mittels Chemilumineszenz. Der primäre Antikörper (1°Ab, Quelle: Hase) bindet an das membranständige Protein, gegen das er gerichtet ist. Der sekundäre Antikörper (2°Ab) ist gegen Hasen-IgG gerichtet und bindet daher an den primären Antikörper. Die an den sekundären Antikörper konjugierte Meerrettichperoxidase (HRP) katalysiert die Chemilumineszenzreaktion. Aus Cell Signaling, 2018 (271). Rechts oben: Reaktionsgleichung der Chemilumineszenzreaktion. Luminol wird mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) katalysiert durch HRP zu 3-Aminophthalat oxidiert. Hierbei entsteht Stickstoff (N_2) und sichtbares Licht. Aus: Farrell, 2010 (272). Rechts unten: Exemplarische Darstellung eines röntgenentwickelten Western-Blots von GAPDH. In der ersten Spalte ist der nachgezeichnete Proteinstandard mit Farbmakierungen bei 25 kDa und 75 kDa Proteinmasse dargestellt. In der zweiten Spalte sind die Positivkontrolle, in der dritten Spalte die Negativkontrolle und in den restlichen Spalten Probenlysate mit Nachweis von GAPDH bei 37 kDa zu finden.

Die endgültige Darstellung der zu untersuchenden Proteine erfolgte mittels Immundetektion und Chemilumineszenz (263, 267). Nach Blockierung der Membran mit 5%-igem bovinem Serumalbumin (BSA) erfolgte die Inkubation mit dem im Blockierungspuffer gelösten pri-

mären Antikörper für das jeweils nachzuweisende Proteinantigen. Da in dieser Versuchsreihe lediglich Antikörper verwendet wurden, welche aus Hasen gewonnen wurden, erfolgte im nächsten Schritt die Inkubation mit dem an Meerrettichperoxidase (HRP) gebundenen, sekundären Antikörper gegen Hasen-Immunglobulin G. Diese nun entstanden Komplexe aus Proteinantigen, primärem Antikörper und sekundärem Antikörper mit HRP konnten mit Hilfe von Chemilumineszenzlösungen dargestellt werden (267) (Abb. 18). Das durch Chemilumineszenzreaktion entstandene Licht konnte schließlich bei kurzer Expositionszeit auf einen Röntgenfilm gebracht und durch einen Röntgenentwickler sichtbar gemacht werden (Abb. 18). Die somit dargestellten Proteinbanden entsprachen in Dichte und Dicke direkt proportional dem effektiven Proteingehalt des dargestellten Proteins.

3.3.4 Laborchemische Serumanalysen

Photometrische Tests für Hitachi 917	Anbieter
Creatinine FS	DiaSys Deutschland Vertriebs-GmbH, Flacht (D)
Bilirubin Auto Total FS	DiaSys Deutschland Vertriebs-GmbH, Flacht (D)
Cholinesterase FS	DiaSys Deutschland Vertriebs-GmbH, Flacht (D)
ASAT (GOT) FS (IFCC mod.)	DiaSys Deutschland Vertriebs-GmbH, Flacht (D)
ALAT (GPT) FS (IFCC mod.)	DiaSys Deutschland Vertriebs-GmbH, Flacht (D)
GLDH FS DGKC	DiaSys Deutschland Vertriebs-GmbH, Flacht (D)

Tab. 6: Tabellarische Darstellung der für die laborchemischen Serumanalysen verwendeten, photometrischen Tests für das Laboranalysegerät „Hitachi 917“ der Firma Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz (CH).

In Kooperation mit dem Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München wurde das gewonnene Serum (vgl. 3.2.4) hinsichtlich des Gehalts verschiedener laborchemischer Parameter mit Hilfe standardisierter Verfahren bestimmt. Maschinell gestützt konnte so der Gehalt des Nierenretentionsparameters Kreatinin, des Cholestaseparameters Gesamt-Bilirubin, des Lebersyntheseparameters Cholinesterase (ChE), sowie der Parameter der Leberzellschädigung Aspartat-Aminotransferase (GOT), Alanin-Aminotransferase (GPT) und Glutamatdehydrogenase (GLDH) im Serum nachgewiesen werden. Dies gelang durch die photometrischen Eigenschaften des Laboranalysegeräts „Hitachi 917“ der Firma Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz (CH), und die spezifisch für dieses Gerät entwickelten und etablierten Testverfahren (Tab. 6).

Die Kreatininbestimmung im Serum erfolgte durch Zugabe von Pikrinsäure im Rahmen eines kinetischen Tests nach Jaffé (273). Hierdurch entstand ein orangeroter Farbkomplex, dessen

Extinktion in der weiteren Folge bei 492 nm nach einer und zwei Minuten bestimmt wurde. Die Differenz dieser beiden Extinktionsergebnisse verhielt sich hierbei direkt proportional zur Kreatininkonzentration, welche somit errechnet werden konnte (273).

Durch die Zugabe von diazotiertem DCA zur Serumprobe war die Bestimmung von Bilirubin möglich (274). Zunächst wurde die Extinktion des Serums bei 546 nm nach Zugabe einer Phosphatpufferlösung gemessen. In der weiteren Folge wurden Hydrogenchlorid (HCl) und DCA zur Probe gegeben, welches mit direktem Bilirubin einen roten Azofarbstoff in saurem Milieu bildet, dessen Extinktion ebenfalls bestimmt wurde (274). Aus der Extinktionsdifferenz ließ sich dann der Gesamtbilirubingehalt errechnen (274).

Das Prinzip der Cholinesterasenbestimmung beruht auf dem Prinzip, dass Butyrylthiocholin durch Cholinesterase zu Thiocholin und Butyrat hydrolysiert wird (275). Das hierbei entstehende Thiocholin wiederum kann gelbes Kaliumhexacyanoferrat(III) zu farblosem Kaliumhexacyanoferrat(II) reduzieren (275). Dieser Farbverlust konnte bei 405 nm als Extinktionsabnahme photometrisch nach definierten Inkubationszeiten im zeitlichen Verlauf gemessen werden und ergab hierbei der Cholinesterasekonzentration (275).

GOT katalysiert die Reaktion von L-Aspartat und 2-Oxoglutarat zu L-Glutamat und Oxalacetat (276). Für den Indikatorschritt spielt hierbei das entstandene Oxalacetat die entscheidende Rolle. Dieses wird nämlich unter Verbrauch von NADH durch die Malatdehydrogenase zu L-Malat und oxidiertem NAD^+ verstoffwechselt (276). NADH stellt hierbei die relevante Messgröße dar, da es bei UV-Licht von 340 nm photometrisch gemessen kann (277). Die GOT-Konzentration steht hierbei in direkt proportionalem Verhältnis zur Abnahme der NADH-Extinktion und ließ sich somit errechnen (276).

Die GPT-Messung konnte analog durchgeführt werden, da erneut NADH die relevante Messgröße darstellte (277). Der NADH-Verbrauch und damit deren Extinktionsabnahme resultierten nun aus der durch die LDH katalysierte Reaktion von Pyruvat und NADH zu L-Lactat und NAD^+ (278). Das Pyruvat selbst stammte aus der von GPT katalysierten Verstoffwechslung von L-Alanin und 2-Oxoglutarat zu L-Glutamat und Pyruvat. So entsprach die Extinktionsabnahme von NADH erneut direkt proportional der GPT-Konzentration (278).

NADH stellte auch bei der Bestimmung der GLDH-Konzentration die Messgröße dar, deren Extinktionsabnahme bestimmt wurde und aus der sich die GLDH-Konzentration kalkulieren

ließ (279). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von NADH zu α -Ketoglutarat und Ammoniumacetat nach vorheriger Inkubation gestartet, da diese mit NADH und katalysiert von GLDH zu L-Glutamat, NAD^+ und Wasser verstoffwechselt werden (279).

3.3.5 Glutathion-Messung

Um die Auswirkungen des Glutathion-Metabolismus untersuchen zu können, wurde sich für eine intrazelluläre, photometrische Messung von Substrat und Produkt der Glutathion-Peroxidase 4 entschieden.

Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	Hersteller
Perchlorsäure (1,0 M)	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Phosphat-Puffer (0,1 M Kaliumphosphat; 5mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), pH: 7,4)	Merck KGaA, Darmstadt (D)
5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB; 1 mM)	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH; 5 mM)	Hoffmann-La Roche AG, Basel (CH)
Glutathionreduktase (GR; 24 U/ml)	Hoffmann-La Roche AG, Basel (CH)
Standard-GSSG-Stocklösung (1 mM)	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Perchlorsäure (1,0 M) mit EDTA (2 mM) und N-Ethylmaleimid (NEM; 50 mM)	Merck KGaA, Darmstadt (D)
N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS; 0,3 M)	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Kalilauge (KOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Macherey-Nagel™ Chromafix™ C18 Festphasenextraktionskartuschen	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Destilliertes Wasser	Apotheke des Klinikums der Universität München, München (D)
Pipettierhilfen und Pipettenspitzen in verschiedenen Größen	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Reaktionsgefäße in verschiedenen Größen	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Spektrophotometer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld (D)

Tab. 7: Tabellarische Darstellung der für die Glutathion-Bestimmung verwendeten Reagenzien, Verarbeitungsinstrumente und Laborbedarf mitsamt Herstellerangaben.

3.3.5.1 Bestimmung der Gesamt-Glutathionkonzentration

Zunächst erfolgte die Bestimmung des Gesamt-Glutathiongehalts im Lebergewebe entsprechend des kinetischen, spektralphotometrischen Tests, der von Tietze et al. Im Jahre 1969 erstbeschrieben wurde (280). Hierzu mussten erneut Teile des schockgefrorenen LAS

und RAS (vgl. 3.2.4) unter stetiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff mit einem Micropistill gemörst werden. Das nun pulverisierte Lebergewebe wurde mit Perchlorsäure gelöst und in der weiteren Folge bei 5000 x g zentrifugiert, so dass der proteinfreie Überstand abpipettiert, in Phosphat-Puffer verdünnt und als Probenmaterial weiterverwendet werden konnte. Der Probenansatz des Tietze-Tests wurde in der hier beschriebenen Versuchsreihe durch die Mischung von Phosphat-Puffer, Probenmaterial, NADPH, DTNB und Glutathion-reduktase gestartet.

Der kinetische Test nach Tietze macht sich das in Formel 1 dargestellte Prinzip zu Nutze. Zwei GSH-Moleküle werden von DTNB zu GSSG oxidiert, wobei zwei TNB-Moleküle entstehen. Während sich DTNB farblos verhält, stellt TNB in Lösung einen gelben Farbstoff dar, dessen Extinktion bei 412 Nanometern spektralphotometrisch erfasst werden kann (281). Die DTNB-Reduktion verläuft hierbei nicht-enzymatisch, da sich DTNB durch eine hohe Rezeptoraffinität für Thiol-Gruppen auszeichnet, wie sie in reduziertem GSH zu finden ist (282). Die Geschwindigkeit der TNB-Bildung, deren Extinktion im zeitlichen Verlauf erfasst wurde, verhält sich konstant zur Gesamtglutathion-Konzentration, wenn jene konstant gehalten werden kann (280). Dies gelingt, indem dem Probenansatz GR und NADPH zugegeben werden. Das in der ersten Reaktion entstandene GSSG wird somit direkt durch die GR neben Anfallen von NADP^+ zu 2 GSH-Molekülen reduziert. Diese stellen nun wieder das Substrat der ersten Reaktion dar, wodurch sich ein konstanter Reaktionskreislauf und eine konstante TNB-Bildungsgeschwindigkeit ergeben. Diese wurde als Extinktionsdifferenz erfasst, aus welcher sich die Gesamtglutathion-Konzentration errechnen ließ (280).



Formel 1: Schematische Reaktionsgleichungen der für den kinetischen Test nach Tietze relevanten chemischen Formeln. Zwei GSH-Moleküle werden von DTNB nichtenzymatisch zu GSSG oxidiert, wobei das gelbfarbene TNB-Molekül zweimal anfällt. GSSG kann im nächsten Schritt von der Glutathionreduktase katalysiert in einer Reaktion mit NADPH erneut zu zwei GSH-Molekülen reduziert werden. Hierdurch wird eine konstante TNB-Bildungsgeschwindigkeit gewährleistet.

3.3.5.2 Bestimmung der GSSG-Konzentration

Im nächsten Schritt konnte oxidiertes GSSG nachgewiesen werden. Dies gelang mit Hilfe einer abgewandelten Variante des Tietze-Tests, welche von Lauterburg et al. 1984 präsentiert wurde (283). Wie bereits zuvor beschrieben wurde erneut schockgefrorenes Lebergewebe unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Dieses Mal erfolgte die Lösung in Perchlorsäure, wel-

cher zuvor EDTA und N-Ethylmaleimid (NEM) zugesetzt wurde. NEM hat in diesem Versuchsaufbau erhöhte Relevanz, da es zuverlässig das im Lebergewebe befindliche GSH zu einem stabilen Komplex bindet und somit die unweigerliche Autooxidation des GSH zu GSSG verhindert (283). Das in Lösung gebrachte Probenmaterial wurde im Folgenden erneut zentrifugiert, abpipettiert und auf einen pH von 6,2 eingestellt. Das überschüssige NEM musste nun durch die Technik der Festphasenextraktion (SPE) eliminiert werden, da sonst durch GSSG-Reduktion in der Folge anfallendes GSH ebenfalls in NEM-Bindung gehen würde. Nach Elimination des NEM konnten die isolierten Probenbestandteile mit Phosphatpuffer vom Sorbens der SPE-Kartusche eluiert werden, so dass nun NEM-freies Probenmaterial gewonnen werden konnte (284). Dieses Probenmaterial konnte nun wie in 3.3.5.1 beschrieben dem Tietze-Test zugeführt werden. Das errechnete Ergebnis entsprach nun der oxidierten GSSG-Konzentration im Gewebe, da zuvor intrahepatisch befindliches GSH für die Reaktion durch die NEM-Konjugation unbrauchbar gemacht wurde.

3.3.5.3 Bestimmung der GSH-Konzentration

Das reduzierte GSH ließ sich nach Nachweis der Gesamt-Glutathionkonzentration, sowie der GSSG-Konzentration errechnen. Da die Gesamt-Glutathionkonzentration der Summe der Konzentration von GSH und GSSG entspricht, errechnete sich die GSH-Konzentration durch Subtraktion der GSSG-Konzentration von der Gesamt-Glutathionkonzentration (Formel 2).

$$c_{\text{Gesamt-Glutathion}} = c_{\text{GSSG}} + c_{\text{GSH}} \qquad c_{\text{GSH}} = c_{\text{Gesamt-Glutathion}} - c_{\text{GSSG}}$$

Formel 2: Mathematische Gleichungen zur Berechnung der Stoffmengenkonzentration (c) von Gesamt-Glutathion (links) und reduziertem GSH (rechts).

3.4 Auswertungsverfahren

3.4.1 Statistische Methoden

Die angewandten statistischen Verfahren zur Auswertung von Vergleichen und Ergebnissen der Versuchsreihen in Bezug auf ihre jeweilige statistische Signifikanz wurden mit Hilfe des Computerprogrammes „GraphPad Prism 7 for Windows“ (Version 7.02) der Firma GraphPad Software Inc., La Jolla (USA) durchgeführt. Ergebnisse mit einem p-Wert, der sich kleiner als 0,05 verhielt, wurden hierbei als signifikant angenommen. Die Software ermöglichte zusätzlich neben dem Errechnen von Mittelwert, Standardabweichung und des Standardfehlers des Mittelwerts auch die graphische Auswertung und Darstellung der verschiedenen Testverfahren.

In den hier beschriebenen Experimenten wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt und kam zum Einsatz, wenn die Mittelwerte von exakt zwei Gruppen miteinander verglichen wurden. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde das etablierte Testverfahren der Varianzanalyse (ANOVA) angewandt. Da bei zunehmender Anzahl der multiplen Vergleiche im Rahmen der Varianzanalyse das Risiko für primäre Fehler steigt, wurden nach Durchführung einer ANOVA diese zusätzlich mit einem Post-Hoc-Test nach Tukey, wenn alle Mittelwerte einer Gruppe mit sämtlichen anderen Mittelwerten verglichen werden sollten, und nach Šidák, wenn lediglich Mittelwerte von Subgruppen miteinander verglichen wurden, nachgetestet (285-288).

Wurde eine Proportion oder Differenz von zwei Gruppenmittelwerten mit der Proportion oder Differenz von zwei gepaarten, anderen Gruppenmittelwerten verglichen, so wurden die jeweilige Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwerts der Differenz manuell errechnet, um diese in der weiteren Folge wieder einer Signifikanzanalyse zuzuführen. Hierzu wurden folgende Formeln angewandt (289, 290):

$$\sigma_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2} = \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}} \qquad SE_{\mu_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}} = \frac{\sigma_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}}{\sqrt{n_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}}}$$

Formel 3: Links: Mathematische Formel zur Berechnung der Standardabweichung σ der Differenz $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ der Mittelwerte der Gruppen x_1 und x_2 . n beschreibt die jeweilige Gruppengröße, σ die Standardabweichung des jeweiligen Gruppenmittelwerts. Rechts: Mathematische Formel zur Berechnung des Standardfehlers SE des Mittelwerts μ der Gruppendifferenz $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$.

3.4.2 Optische Flächenfraktionsanalyse

Die Auswertung der in 3.3.2 angefertigten TUNEL-Assays der Lebergewebeschnitte erfolgte mit optischer Flächenfraktionsanalyse. Hierzu wurde das Java-basierte Open Source-Bildverarbeitungsprogramm „ImageJ 1.47v“ verwendet, welches vom „Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (LOCI)“ der University of Wisconsin-Madison (USA) vertrieben wird (291). Das Programm ermöglicht vielfältige Einsatzmöglichkeiten zur Bearbeitung und Auswertung wissenschaftlich erfasster Bilder, insbesondere von mikroskopischen Aufnahmen (292). Um eine objektive Analyse der im TUNEL-Assay erfassten TUNEL-positiven Zellen in den Gewebeschnitten zu ermöglichen, wurde der Anteil des TUNEL-positiven Signals an der Gesamtfläche des Gewebeschnitts ausgewertet. Dieses verhält sich direkt proportional zu der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen und wurde im Weiteren für den Vergleich zwischen den Gruppen verwendet. Die einzelnen Schritte der Auswertung sind in Abb. 19

dargestellt. Um Hintergrundrauschen und Fehlanalysen zu unterdrücken, wurden zunächst der Kontrast und die Helligkeit des Bildes so angepasst, dass lediglich das fluoreszierende Signal als kräftiges Grün auf schwarzem Hintergrund übrig blieb. Im nächsten Schritt wandelte das Programm das grün-schwarze-Bildsignal in ein schwarz-weißes Binärsignal um. Nun konnte „ImageJ“ den Anteil des schwarzen Signals an der Gesamtfläche als „Area Fraction“, zu Deutsch Flächenfraktion, errechnen.

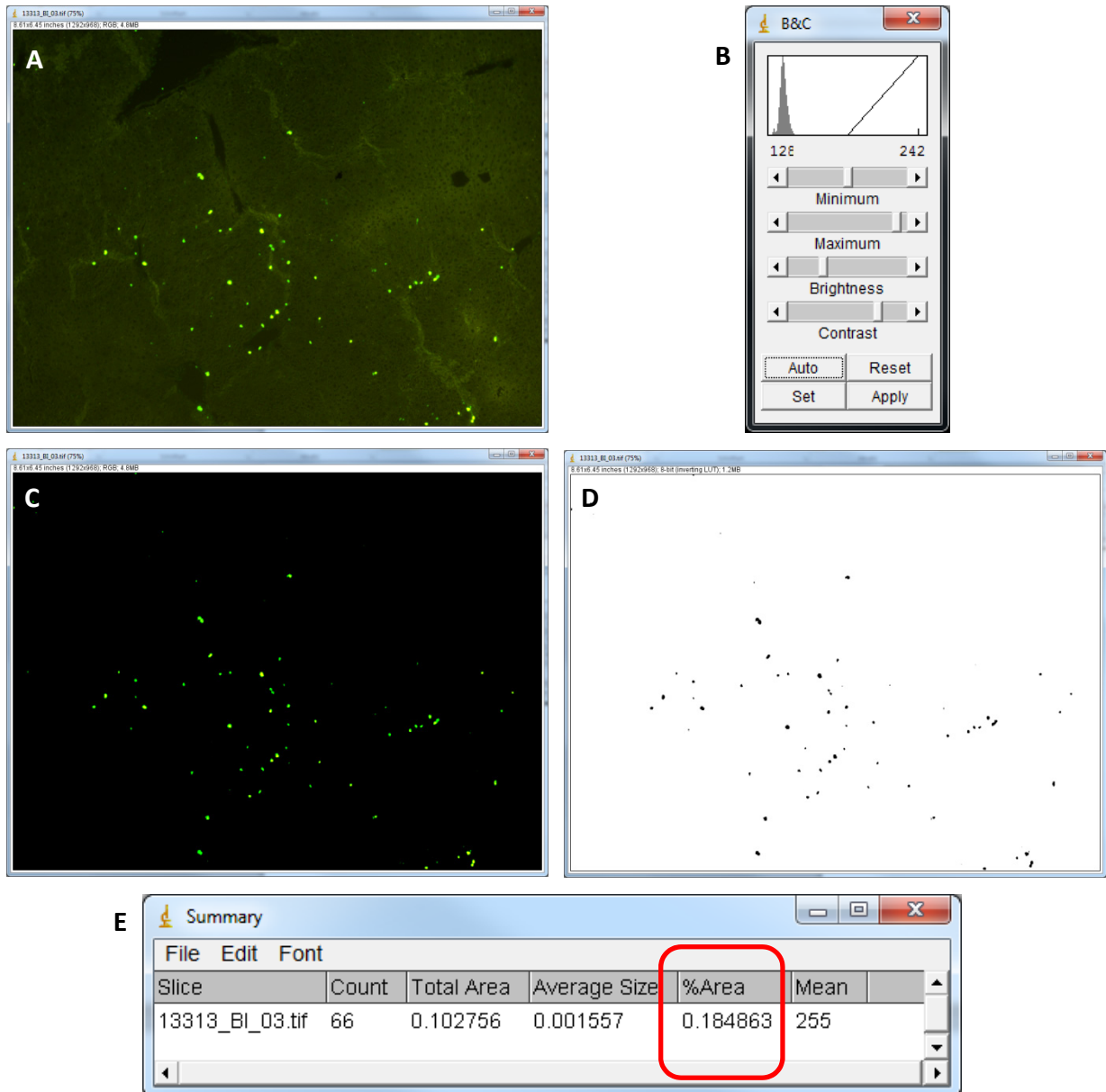


Abb. 19: Exemplarische Darstellung der Arbeitsschritte der Auswertung eines TUNEL-Assays mittels Flächenfraktionsanalyse mit dem Programm „ImageJ“. A: Eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Gewebeschnittes in 10x Vergrößerung nach TUNEL-Assay wird mit dem Programm geöffnet. B: Helligkeit (Brightness) wird reduziert und der Kontrast (Contrast) so weit erhöht, dass lediglich die fluoreszenzmarkierten Zellen auf schwarzem Untergrund sichtbar sind (C). D: Mit der Binäreinstellung des Programms wird aus dem grün-schwarzen Bild ein schwarz-weißes Binärbild erstellt. E: Das Binärbild kann mit Hilfe des Programmes ausgewertet werden und der Anteil der schwarzen Areale am Gesamtbild dargestellt werden (rote Markierung). Diese Flächenfraktion entspricht direkt proportional dem Anteil abgestorbener Zellen.

3.4.3 Optische Dichtemessung

Ebenfalls mit dem Programm „ImageJ“ erfolgte die Bearbeitung und Auswertung der Western Blot-Ergebnisse. Die dargestellten Proteinbanden konnten nach Einscannen der auf Röntgenfilm projizierten Western Blots einer automatisierten, optischen Dichtemessung unterzogen werden, deren Arbeitsschritte in Abb. 20 dargestellt sind. Die hierbei erhaltenen Dichtewerte verhielten sich direkt proportional zum jeweiligen Proteingehalt im Gewebe und konnten daher zu weiterer Berechnung verwendet werden.

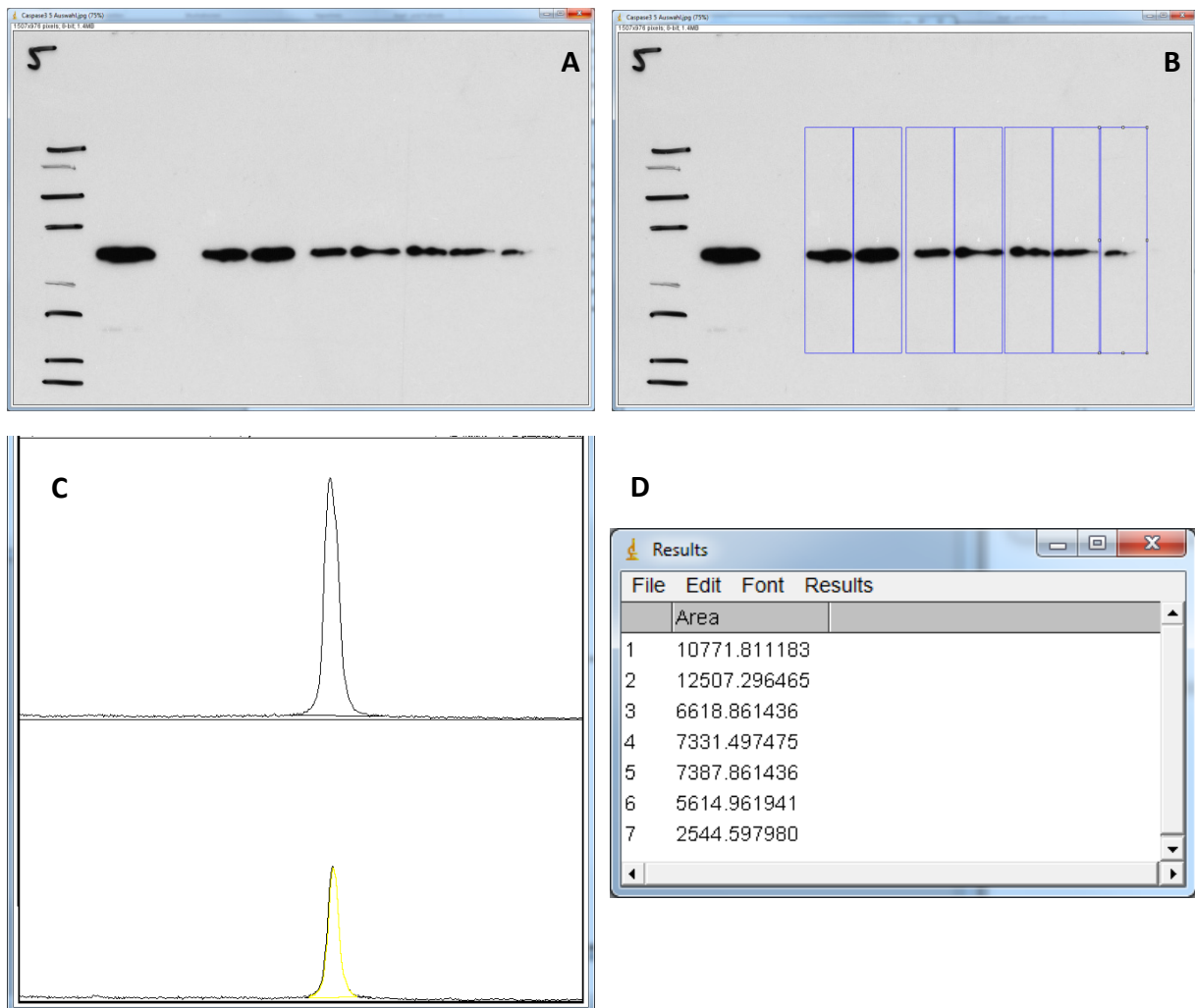


Abb. 20: Exemplarische Darstellung der Arbeitsschritte der Auswertung eines Western Blots mittels optischer Dichtemessung mit dem Programm „ImageJ“. A: Ein auf Röntgenfilm projizierter und aufgenommener Western Blot wird mit dem Programm geöffnet. B: Die einzelnen Laufbahnen (hier der Proben ohne Positiv- und Negativkontrolle) mitsamt Proteinbanden werden mit einem angepassten Rechteck markiert und automatisch vom Programm nummeriert (hier 1 – 7). C: Das Programm erstellt aus den Dichtewerten der Laufbahnen Parabeln, die den Proteinbanden entsprechen. Das von der Basislinie abgehobene Grundrauschen entspricht der Färbung des Hintergrunds. Diese wird durch Einfügen einer Horizontallinie auf Höhe des Grundrauschens für die Auswertung eliminiert. Durch Auswahl einer abgeschlossenen Parabel (hier die unterste) wird deren Fläche unter der Kurve und damit der Dichtewert der Proteinbande berechnet (D).

Hierzu wurden zunächst die einzelnen Laufbahnen der Proteine auf dem Western Blot-Film manuell im Programm ausgewählt. Im nächsten Schritt erfolgte eine automatisierte Dichte-

bestimmung der Proteinbanden innerhalb der Laufbahnen. Die Proteinbanden wurden nun entsprechend ihrer Dichte als verschieden große Parabeln dargestellt. Die Basislinie neben den jeweiligen Parabeln entsprach hierbei der Hintergrundfärbung, welche durch manuelles Verlängern der Basislinie innerhalb einer jeden Parabel eliminiert wurde. Im letzten Schritt wurde nun die Fläche unter der Kurve für jede Proteinbande als Pixelfläche berechnet, die sich somit proportional zur Dichte der Proteinbande und eben deren Proteingehalt verhielt. Western Blot-Ergebnisse wurden in der weiteren Folge lediglich als Relationen, zum Beispiel als Proportion des phosphorylierten Anteils zum Gesamtanteil eines Proteins angewandt, beziehungsweise zur Positivkontrolle eines Proteins, weshalb die Einheit Pixel in den Folgeberechnungen wieder herausgekürzt wurde.

3.4.4 Spektralphotometrie

Sowohl in Proteinmengenbestimmung mittels BCA-Assay (vgl. 3.3.3), als auch in der laborchemischen Serumanalyse (vgl. 3.3.4), sowie für den Nachweis der Glutathionkonzentration im Lebergewebe (vgl. 3.3.5) wurde die Technik der Spektralphotometrie angewandt. Die Photometrie ermöglicht als etabliertes Verfahren der Laboranalytik die Bestimmung der Konzentration von gelösten Substanzen in einer Lösung durch Lichtabsorption, wenn die zu untersuchenden Substanzen farbige Eigenschaften besitzen oder zuvor durch spezifische chemische Reaktionen in eine farbige Verbindung gebracht wurden (293). Wird zur Detektion der Substanzen monochromatisches Licht, also Licht einer spezifischen Wellenlänge verwendet, spricht man von Spektralphotometrie (294). Als Maß für die Lichtundurchlässigkeit und somit für die Absorptionsstärke eines Stoffes gilt die Extinktion des Lichtes einer bestimmten Wellenlänge, welche durch Photometer erfasst werden kann (295). Als Grundlage für die Spektralphotometrie gilt das Lambert-Beersche Gesetz (Formel 4). Dieses besagt, dass sich die Extinktion eines Stoffes bei einer Wellenlänge linear proportional zu durchstrahlten Schichtdicke und der molaren Konzentration der Probe verhält (296). Ist das Absorptionsspektrum einer Verbindung also bekannt, so lässt sich aus der gemessenen Extinktion die Stoffkonzentration berechnen (Formel 4).

$$E_{\lambda} = \log \left(\frac{I_0}{I_t} \right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \qquad c = \frac{E_{\lambda}}{\varepsilon_{\lambda} \cdot d}$$

Formel 4: Physikalische Formeldarstellung des Lambert-Beerschen Gesetzes (links), sowie nach Umformulierung nach der molaren Konzentration c (rechts). E = Extinktion bei einer Wellenlänge λ ; I_0 = Intensität des eingestrahnten Lichts; I_t = Intensität des transmittierten Lichts; ε_{λ} = molarer Extinktionskoeffizient eines Stoffes bei λ ; d = Schichtdicke. Nach Spektrum, 1998 (296).

3.5 Versuchsgruppen und -protokolle

Im Folgenden sind die Versuchsprotokolle der Versuchsgruppen, in welchen eine Induktion des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens durchgeführt wurde, schematisch aufgezeichnet. Für jede der hier gezeigten Interventionsgruppen wurde eine Kontrollgruppe mit nahezu identischem Protokoll, jedoch mit der in 3.2.3.2 beschriebenen Scheinoperation untersucht. In sämtlichen Versuchsgruppen betrug die Gruppengröße jeweils $n = 10$.

3.5.1 Hepatischer Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI)

In dieser Gruppe erfolgte keine medikamentöse Vorbehandlung (Abb. 21).

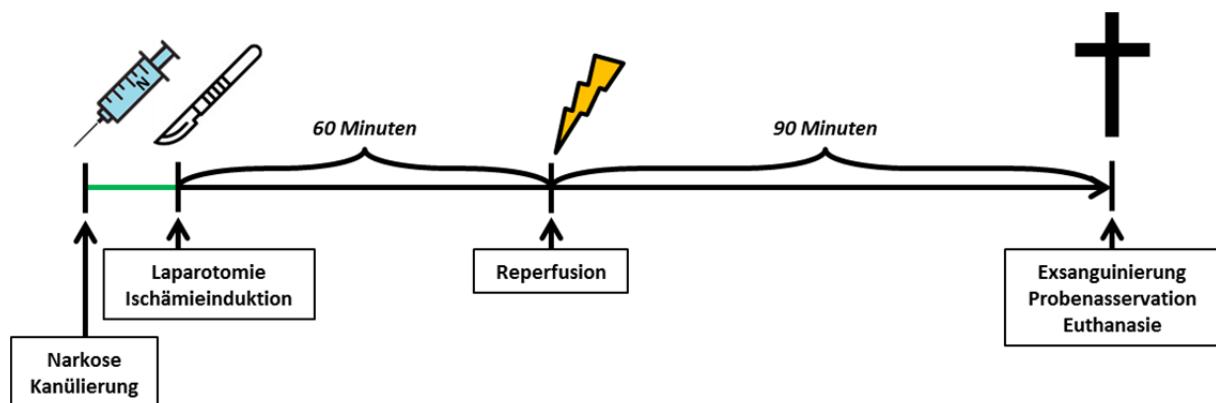


Abb. 21: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls der Versuchsgruppe mit Induktion eines hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens ohne medikamentöse Vorbehandlung.

3.5.2 IRI mit Baicalein- Vorbehandlung

Die Baicalein-Vorbehandlung zur Inhibition der 12/15-Lipoxygenase erfolgte 30 Minuten vor Laparotomie (Abb. 22). Hierzu wurden 120 mg/kg Körpergewicht an Baicalein intraperitoneal verabreicht. Dies entsprach einer applizierten Menge von ca. 3mg Baicalein pro Versuchstier, gelöst in 150µl Dimethylsulfoxid (DMSO).

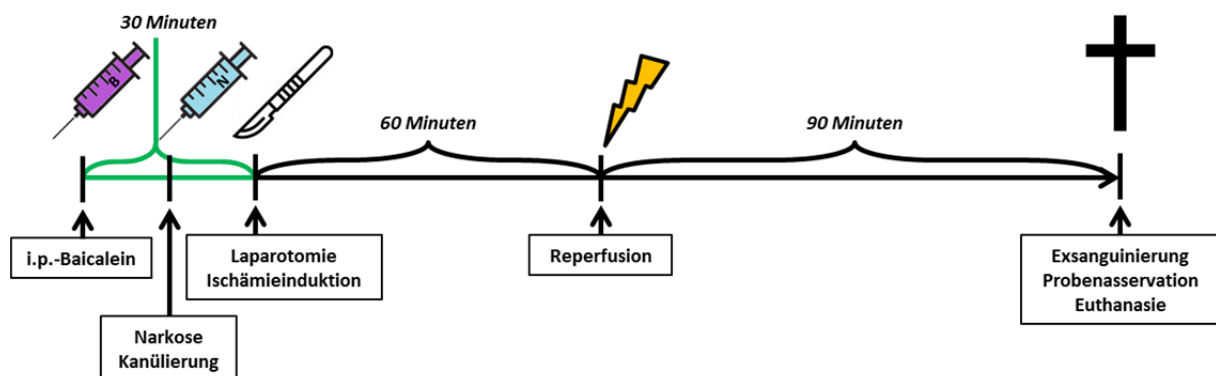


Abb. 22: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls der Versuchsgruppe mit Induktion eines hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens und Baicalein-Vorbehandlung.

3.5.3 IRI mit DMSO-Vorbehandlung

Die alleinigen Auswirkungen der Trägerlösung DMSO, die zur Lösung von Baicalein verwendet wurde, wurden in dieser Versuchsgruppe untersucht. Hier erfolgte die Applikation ebenfalls 30 Minuten vor Laparotomie intraperitoneal (Abb. 23). Wie auch in der Baicalein-Gruppe wurde hierbei ein Gesamtvolumen von 150µl appliziert.

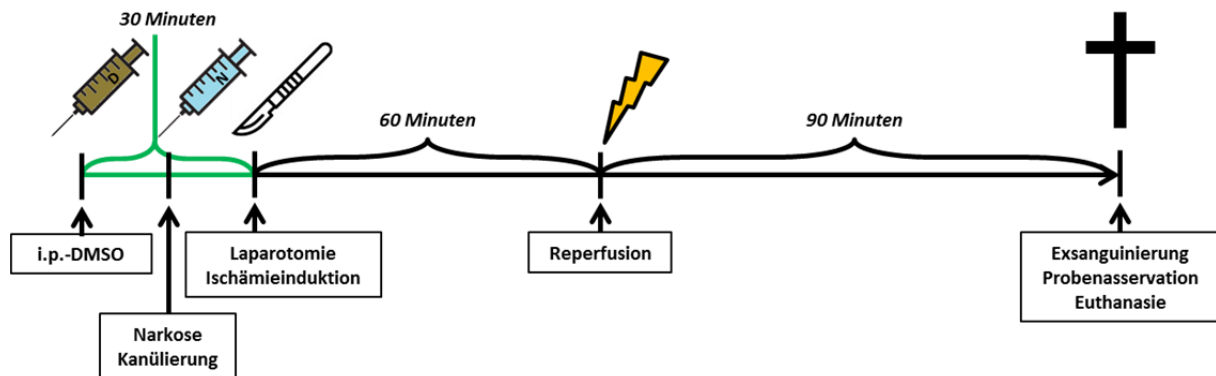


Abb. 23: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls der Versuchsgruppe mit Induktion eines hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens und alleiniger DMSO-Vorbehandlung.

3.5.4 IRI mit Tacrolimus-Vorbehandlung

Die Tacrolimus-Vorbehandlung wurde bereits 24 Stunden vor Laparotomie intiiert (Abb. 24). Hierbei wurde erneut ein Gesamtvolumen von 150µl Lösung intraperitoneal verabreicht. Die Tacrolimusdosis lag in diesem Fall bei 300 µg/kg Körpergewicht, gelöst in 0,9%-iger Kochsalzlösung. Dies entsprach 75 µg an verabreichtem Tacrolimus pro Versuchstier. Unmittelbar vor Laparotomie wurde in diesem Fall keine Vorbehandlung mehr durchgeführt.

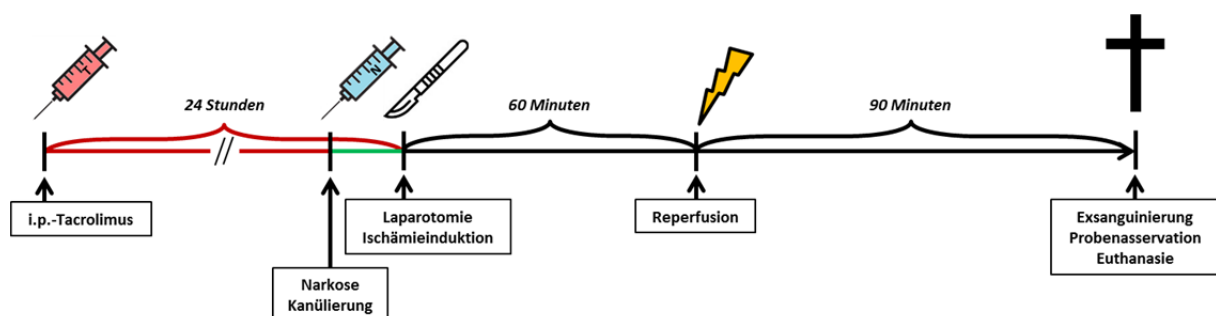


Abb. 24: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls der Versuchsgruppe mit Induktion eines hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens und Tacrolimus-Vorbehandlung.

3.5.5 IRI mit Tacrolimus- & Baicalein-Vorbehandlung

Zuletzt wurde zudem eine Versuchsgruppe untersucht, die die Vorbehandlung von Tacrolimus und Baicalein kombinierte. Wie in den jeweiligen Einzelgruppen erfolgte hierbei eine intraperitoneale Tacrolimusgabe (300 µg/kg Körpergewicht, gelöst in 0,9%-iger Koch-

salzlösung) 24 Stunden vor Laparotomie und eine intraperitoneale Baicalein-Vorbehandlung (120 mg/kg Körpergewicht, gelöst in DMSO) 30 Minuten vor Laparotomie (Abb. 25). Applikationsvolumina waren in beiden Fällen jeweils erneut 150µl.

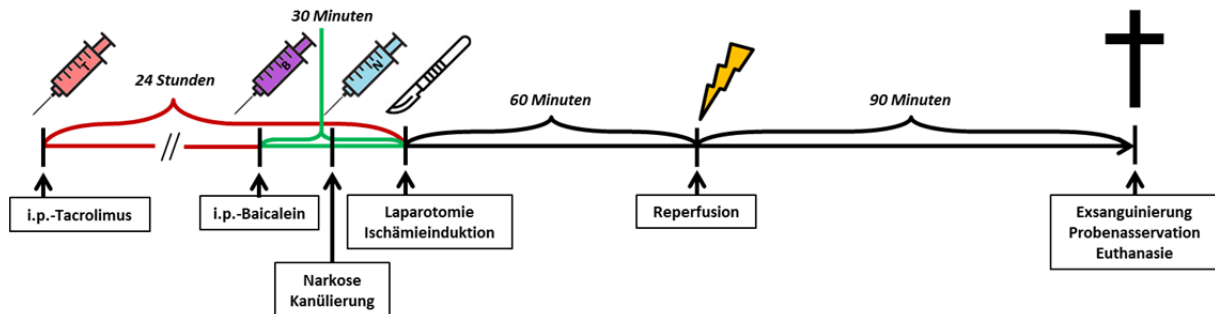


Abb. 25: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls der Versuchsgruppe mit Induktion eines hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens und kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung.

4. Ergebnisse

4.1 Effekte des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens

4.1.1 Kreislaufparameter

Die alleinigen Effekte von Ischämie und Reperfusion der oben genannten Leberlappen auf den Kreislauf des Versuchstieres konnten untersucht werden, indem wir die Blutdruck- und Pulskurven der nicht-vorbehandelten Sham-operierten Mäuse mit denen der nicht vorbehandelten Tiere nach Induktion des Ischämie-Reperfusionsschadens verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Versuchstiere beider Gruppen bei nahezu identischem Ausgangsmitteldruck zum Zeitpunkt der Kanülierung (Sham: 100,7 mmHg vs. IRI: 103,7 mmHg) jeweils im Verlaufe des Experimentes einem kontinuierlichen Blutdruckabfall unterlagen (Abb. 26). Während der Blutdruck zum Ende des Experimentes in der Versuchsgruppe der Sham-operierten Tiere nur leicht auf einen Wert von 82,0 mmHg absank, wiesen die Versuchstiere nach Ischämie und Reperfusion einen deutlich niedrigeren Endmitteldruck von 60,3 mmHg auf. Dieser Unterschied von 21,7 mmHg der zuletzt gemessenen Mitteldrücke war mit einem p-Wert von 0,0294 signifikant.

Weiterhin war festzustellen, dass die Versuchstiere, bei welchen ein IRI induziert wurde, einen kurzfristigen, signifikanten Blutdruckabfall um durchschnittlich 18,0 mmHg in dem Zeitraum von fünf bis acht Minuten nach Reperfusion erlitten ($p = 0,0226$). Dieser zeigte sich im Verlauf der folgenden zehn Minuten fast vollständig reversibel. Da bei den Blutdruckkurven der Sham-operierten Tiere keine solch evidenten Mitteldruckabfälle in Ermangelung einer Reperfusionsphase festzustellen war, konnte auch hier eine deutlich signifikante Kurvendifferenz ($p < 0,001$) errechnet werden. Ab dem Zeitpunkt der Ischämieinduktion erscheint der Mitteldruck der IRI-Gruppe durchschnittlich deutlich niedriger im Vergleich zur Sham-Gruppe. Eine statistische Signifikanz ist phasenweise festzustellen ($p < 0,05$) (s. Abb. 26).

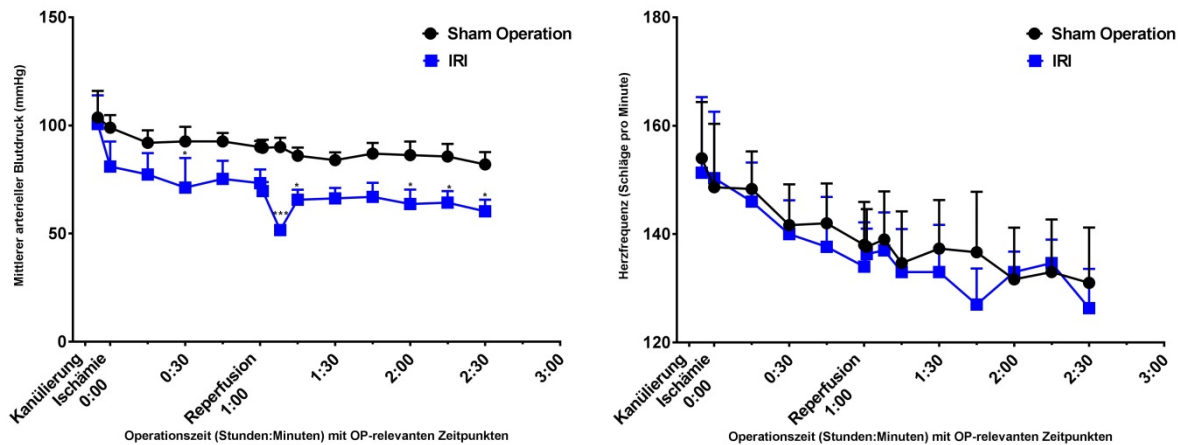


Abb. 26: Graphische Darstellung der Blutdruck- (links) und Pulscurven (rechts) der Versuchsgruppen mit Scheinoperation (schwarze Kurve, Sham Operation) und mit IRI-Induktion (blaue Kurve, IRI) im Verlauf des Experiments. Die Zeitpunkte *Ischämie* und *Reperfusion* sind nur für die IRI-Versuchsgruppe relevant. Statistik (Šidák-Test): *** entspricht einem p-Wert < 0,001; * entspricht einem p-Wert < 0,05. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den Kurven zum jeweiligen Zeitpunkt. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Weiterhin konnte belegt werden, dass es im Rahmen der Herzfrequenzüberwachung analog zu den oben genannten Ergebnissen der Blutdruckkontrolle sowohl in der Sham-Gruppe, als auch in der IRI-Gruppe zu einem Absinken der Herzfrequenz im Verlaufe des Experiments um durchschnittlich 25,0 Schläge pro Minute und somit 16,5% kam (Abb. 26). Im Gegensatz zum arteriellen Mitteldruck ist zwischen den Pulscurven der Sham- und IRI-Gruppe zu keinem Zeitpunkt der Operation ein relevanter oder gar signifikanter Unterschied zu erkennen. Eine pulswirksame Kreislaufreaktion auf die Reperfusionsphase war ebenfalls nicht festzustellen.

4.1.2 Zelltod

Im Weiteren erfolgte die Untersuchung des Zelltods durch mikroskopische Analyse der mittels TUNEL-Assay fluoreszierend angefärbten, abgestorbenen Zellen im explantierten Lebergewebe (vgl. 3.3.2). Um den Effekt der Induktion eines hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens auswerten zu können, wurde der Unterschied des Zelltodanteils an der Gesamtfläche der histologischen Leberschnitte zwischen den scheinoperierten Tieren (Abb. 27 links) und der IRI-Gruppe (Abb. 27 rechts) ohne Vorbehandlung untersucht.

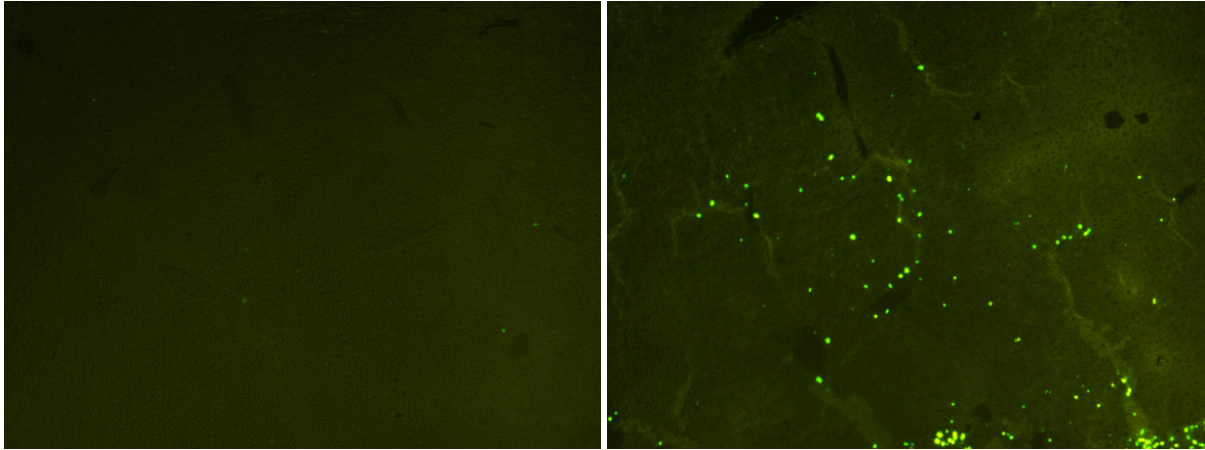


Abb. 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Lebergewebeschnitte nach Scheinoperation (links) und nach Ischämie und Reperfusion (rechts) bei 10x-Vergrößerung und einer Exzitationswellenlänge von 450nm, sowie einer Detektionswellenlänge von 515nm. Fluoreszenzmarkierungen entsprechen abgestorbenen Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass in der Sham-Gruppe postoperativ ein Anteil an toten Zellen am Gesamtgewebe von $0,38\% \pm 0,07\%$ nachzuweisen war. Im Gegensatz hierzu konnte bei der IRI-Gruppe in den betroffenen Leberarealen ein Zelltodanteil von $13,0\% \pm 3,4\%$ gemessen werden. Hierbei war festzustellen, dass nach IRI der Anteil an toten Zellen im Lebergewebe um 12,6% absolut höher war als in der scheinoperierten Gruppe, was wiederum einer relativen Steigerung des Zelltodnachweises um das 33,0-fache entspricht (Abb. 28). Dieser Unterschied war mit p-Wert von 0,003 deutlich signifikant.

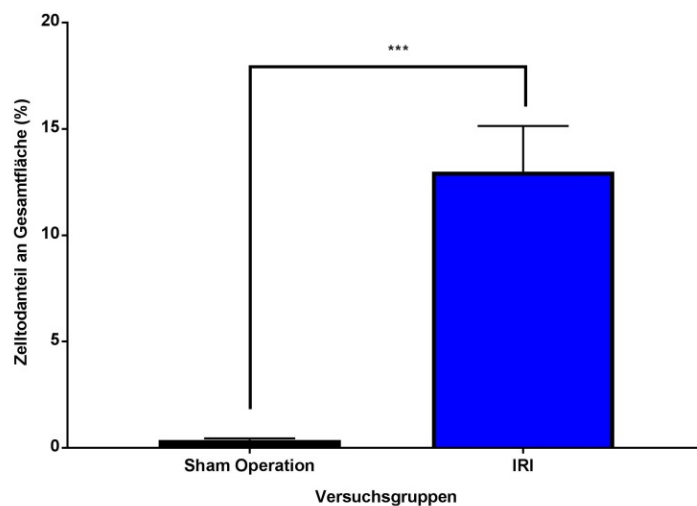


Abb. 28: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Zelltodanalyse im explantierten Lebergewebe mittels TUNEL-Assay in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe (blauer Balken, IRI). Statistik (t-Test): *** entspricht einem p-Wert von $< 0,001$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

4.1.3 Proapoptotische Enzyme

Mit Hilfe von Western Blot-Analysen wurden die Proteinmengen verschiedener, zuvor genannter, proapoptotischer Enzyme im explantierten Lebergewebe gemessen. Dies wurde durchgeführt, um nach densitometrischer Auswertung der Proteinbanden die Proteinaktivitäten der einzelnen Enzyme berechnen zu können und somit Aussagen über den Einfluss des Ischämie-Reperfusionsschadens auf das jeweilige Enzymregulationsverhalten treffen zu können. Hierzu wurden jeweils die Enzymaktivitäten nach Ischämie und Reperfusion mit jenen der Sham-operierten Gruppe verglichen.

4.1.3.1 ERK1/2

Die Aktivität der p44/42-Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (ERK1/2) konnte durch Bildung eines Quotienten aus der phosphorylierten und damit aktivierten Form von ERK1/2 und des gesamten ERK1/2-Gehalts im Gewebe errechnet werden (Abb. 29). Hierbei konnte festgestellt werden, dass die ERK1/2-Aktivität durch stattgehabte Ischämie und Reperfusion im Vergleich zur Sham-Operation deutlich um das 5,0-fache gesteigert werden konnte. Während bei der Sham-Gruppe der ERK-Aktivitätsquotient mit $0,085 \pm 0,023$ gemessen werden konnte, lag er in der IRI-Gruppe bei $0,51 \pm 0,15$. Wenngleich damit ein deutlich positiver Regulationstrend in der ERK-Aktivität festzustellen war, war dieses Ergebnis knapp nicht signifikant ($p = 0,0674$).

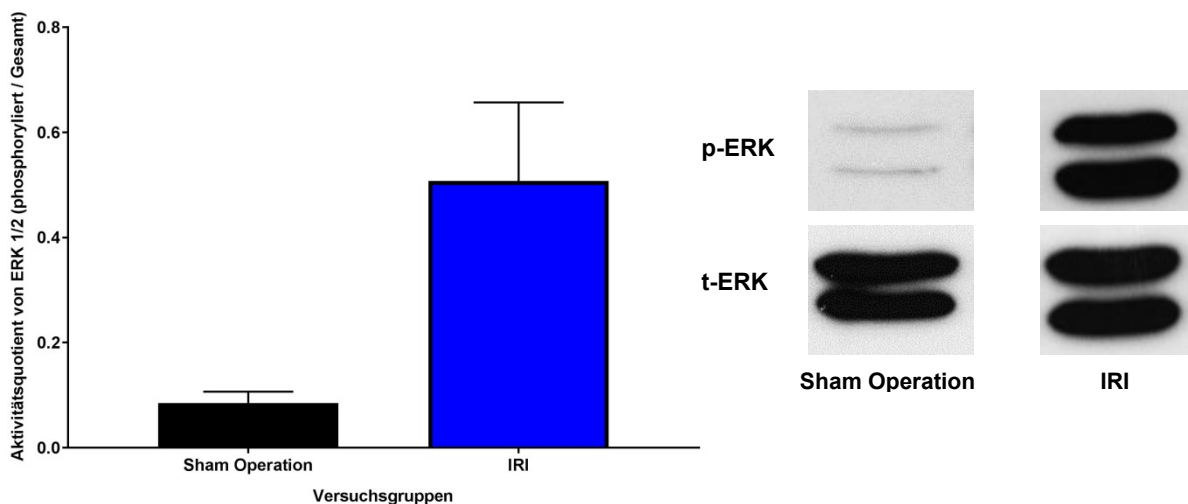


Abb. 29: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 und Gesamt-ERK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe (blauer Balken, IRI). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 (oben, p-ERK) und Gesamt-ERK (unten, t-ERK) nach Scheinoperation (links, Sham Operation) und nach Ischämie und Reperfusion (rechts, IRI), jeweils bei 42 und 44 kDa.

4.1.3.2 SAPK/JNK

Bei Untersuchung des Aktivitätsquotienten der Stress-aktivierten-Proteinkinase (SAPK/JNK), welcher durch Teilung der aktivierten und phosphorylierten Proteinmasse durch das Gesamtprotein berechnet werden konnte, konnte ein vergleichbares Ergebnis festgestellt werden. Der Quotient konnte nach IRI-Induktion mit $0,89 \pm 0,20$ gemessen werden, während er in der Sham-Gruppe nur bei $0,054 \pm 0,005$ lag (Abb. 30). Dies entsprach einer Steigerung der Enzymaktivität um das 15,4-fache und konnte mit einem p-Wert von 0,0131 als signifikante Differenz bestätigt werden.

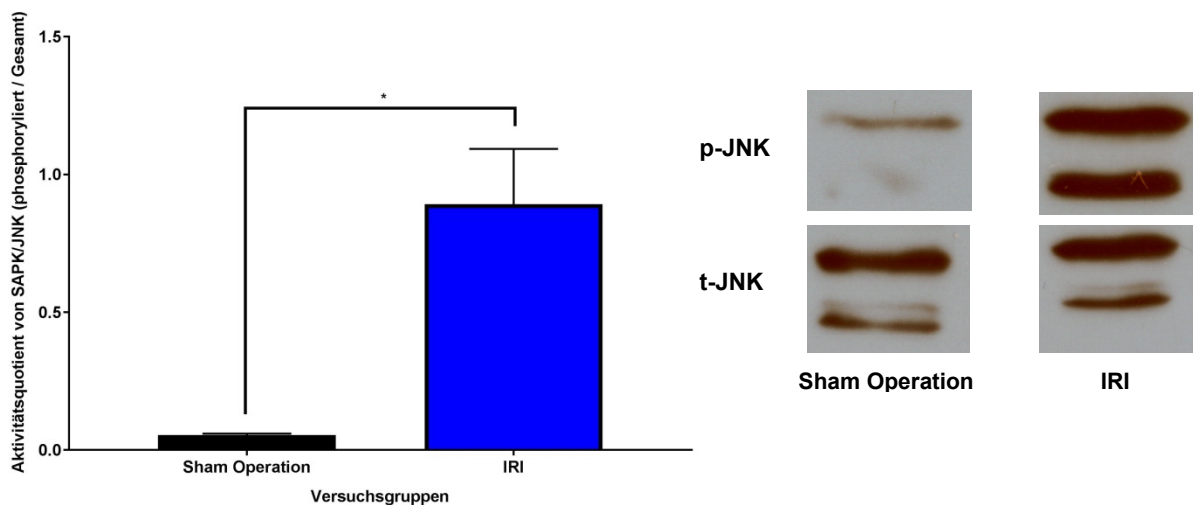
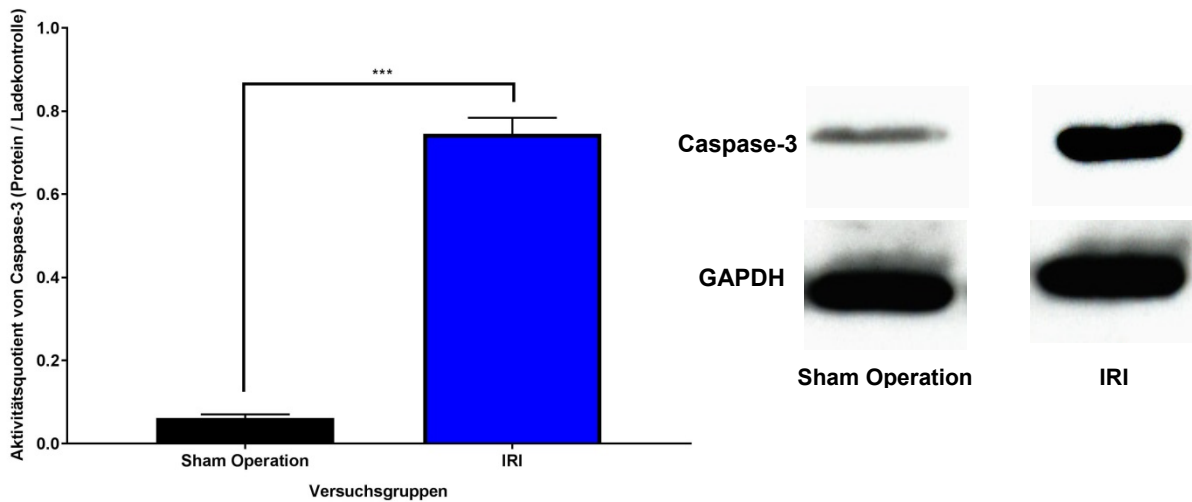


Abb. 30: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK und Gesamt-SAPK/JNK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe (blauer Balken, IRI). Statistik (t-Test): * entspricht einem p-Wert von $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK (oben, p-JNK) und Gesamt-SAPK/JNK (unten, t-JNK) nach Scheinoperation (links, Sham Operation) und nach Ischämie und Reperfusion (rechts, IRI), jeweils bei 46 und 54 kDa.

4.1.3.3 Caspase-3

Das Aktivitätsniveau der Caspase-3 ließ sich durch Bildung eines Quotienten aus der Masse des gemessenen aktivierten Proteins und der verwendeten Ladekontrolle Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ablesen. Nach Ischämie und Reperfusion belief sich der Quotient hierbei auf $0,75 \pm 0,04$, während er in den unbehandelten Leberlappen lediglich bei $0,06 \pm 0,009$ lag (Abb. 31). Somit konnte die Caspase-3-Aktivität signifikant um das 11,1-fache durch IRI-Induktion gesteigert werden ($p < 0,001$).



4.1.3.4 PARP

Auch die Enzymaktivität der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) war bei IRI im Vergleich zur Sham-Operation signifikant gesteigert ($p = 0,0442$) (Abb. 32). Nach Errechnen des Aktivitätsquotienten aus der enzymatisch gespaltenen aktiven Proteinform und des Gesamtproteins konnte eine Hochregulation der Aktivität von $0,082 \pm 0,008$ in den unbehandelten Lebern auf $0,66 \pm 0,18$ in den postischämischen Leberlappen gemessen werden. Dies entsprach einer Erhöhung der Enzymaktivität um das 7,1-fache.

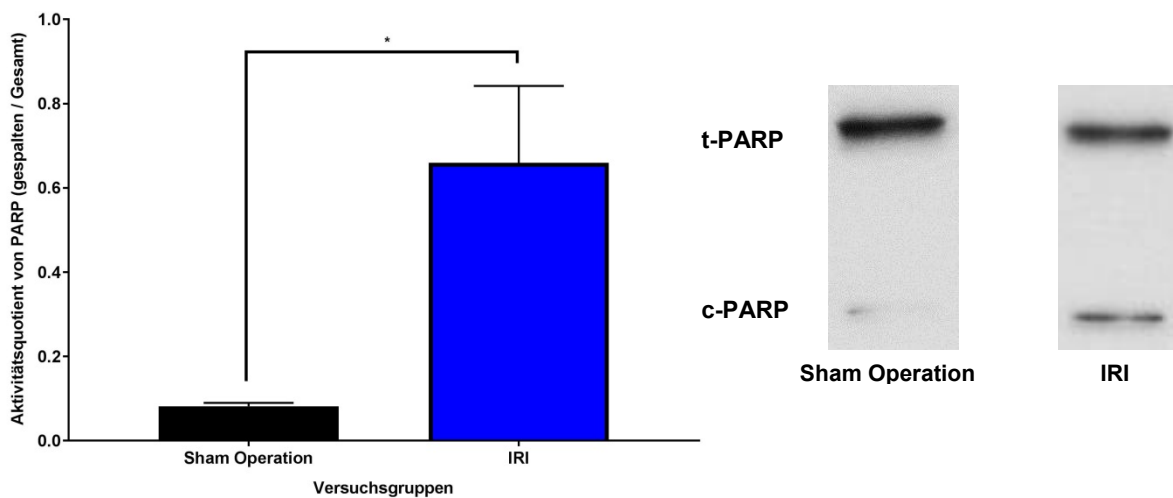


Abb. 32: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, gespaltenen PARP und Gesamt-PARP im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation

(schwarzer Balken, Sham Operation) und nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe (blauer Balken, IRI). Statistik (t-Test): * entspricht einem p-Wert von < 0,05. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, gespaltener PARP (unten, c-PARP) und Gesamt-PARP (oben, t-PARP) nach Scheinoperation (links, Sham Operation) und nach Ischämie und Reperfusion (rechts, IRI), jeweils bei 89 kDa (c-PARP) und 116 kDa (t-PARP).

4.1.4 Alteration der Serum-Leberwertkonzentrationen

Die aus den Serumanalysen gewonnen Ergebnisse sollten dem Zwecke dienen, einerseits durch Unterschiede in der Leberwertkonzentrationen endogene Effekte einer spezifischen Vorbehandlung auf den Organismus, andererseits die Auswirkungen der Therapien auf den Ischämie-Reperfusionsschaden im Serum deutlich zu machen.

Laborchemisch untersuchte Serumparameter	Versuchsgruppen		Steigerungsfaktor nach IRI-Induktion
	<u>Sham Operation</u>	<u>IRI</u>	
Kreatinin (mg/dl)	0,8 ± 0	0,8 ± 0	0% ± 0%
Bilirubin (mg/dl)	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,2	+20,0% ± 8,1%
GOT (U/l)	152,0 ± 34,3	794,0 ± 213,9	+422,4% ± 40,4% (*)
GPT (U/l)	121,0 ± 26,5	928,9 ± 316,9	+667,7% ± 78,9% (**)
GLDH (U/l)	14,5 ± 3,9	131,3 ± 25,7	+805,5% ± 56,7% (*)
ChE (kU/l)	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1	+0,9% ± 1,3%

Tab. 8: Tabellarische Darstellung der Konzentrationen (für Kreatinin und Bilirubin) und Volumenaktivitäten (für GOT, GPT, GLDH & ChE) laborchemisch untersuchter Parameter nach Scheinoperation (Sham Operation) und nach Ischämie und Reperfusion (IRI) im Serum, jeweils ohne medikamentöse Vorbehandlung. Die relative Differenz nach Induktion eines Ischämie-Reperfusionsschaden zur Scheinoperation ist als parameterspezifischer Steigerungsfaktor angegeben. Statistik (t-Test; Šidák-Test): ** Hintergrund entspricht einem p-Wert < 0,01; * entspricht einem p-Wert < 0,05. Signifikanzhinweise beziehen sich auf die durch die parameterspezifischen Steigerungsfaktoren dargestellten Unterschiede. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Wie in Tab. 8 dargestellt, wurden die laborchemisch analysierten Parameter zur Nierenfunktion, Leberzellschädigung, Leberexkretion und Lebersynthese nach Scheinoperation und nach Ischämie und Reperfusion erhoben, sowie im Folgenden parameterspezifisch miteinander verglichen. Die relativen Differenzen zwischen den beiden Versuchsgruppen wurden konsekutiv für jeden untersuchten Blutwert als parameterspezifischer Steigerungsfaktor errechnet, um somit eine Vergleichbarkeit des Einflusses der Induktion eines Ischämie-Reperfusionsschadens zwischen den jeweiligen Blutwerten zu erzeugen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Konzentrationen von Kreatinin und Bilirubin, sowie die Volumenaktivität der Cholinesterase nach postischämischer Schädigung der Leber keine signifikanten Alterationen zeigten (Tab. 8, vgl. Abb. 33). Zwar zeigte die Auswertung von Bilirubin eine tendenzielle Konzentrationssteigerung um 20,0% ± 8,1% in der IRI-Gruppe, eine statistische Signifikanz konnte mit einem p-Wert von 0,61 jedoch nicht dargestellt werden. Im Gegensatz

hierzu war die Steigerung der Volumenaktivität der Aspartat-Aminotransferase (GOT) um $422,4\% \pm 40,4\%$ ($p = 0,0423$) und der Alanin-Aminotransferase (GPT) um $+667,7\% \pm 78,9\%$ ($p = 0,0041$) nach IRI-Induktion ebenso signifikant wie der Steigerungsfaktor von $+805,5\% \pm 56,7\%$ ($p = 0,0200$) für die Volumenaktivität der Glutamatdehydrogenase (GLDH).

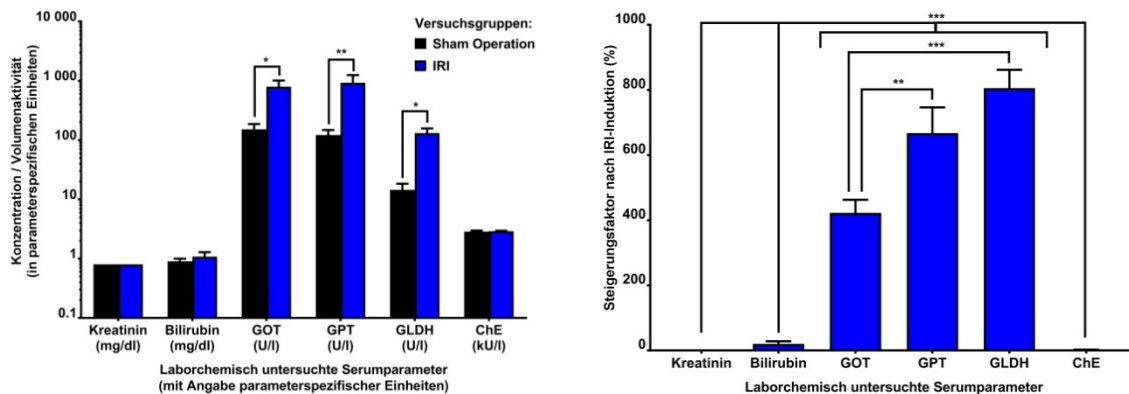


Abb. 33: Links: Graphische, logarithmische Darstellung der Konzentrationen (für Kreatinin und Bilirubin) und Volumenaktivitäten (für GOT, GPT, GLDH & ChE) laborchemisch untersuchter Parameter nach Scheinoperation (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach Ischämie und Reperfusion (blauer Balken, IRI) im Serum, jeweils ohne medikamentöse Vorbehandlung. Die parameterspezifischen Einheiten sind in der X-Achsen-Beschriftung angegeben. Rechts: Graphische Darstellung der parameterspezifischen Steigerungsfaktoren der jeweiligen laborchemisch untersuchten Serumparameter nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zur Scheinoperation, jeweils ohne Vorbehandlung. Statistik (t-Test; Šidák-Test): *** entspricht einem p-Wert von $< 0,001$; ** entspricht einem p-Wert $< 0,01$; * entspricht einem p-Wert $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Wie aus den oben genannten Daten zu erwarten war, zeigten sich die zuvor beschriebenen, signifikanten Steigerungsfaktoren der GOT, GPT und GLDH jeweils hochsignifikant ($p < 0,001$) gegenüber den Steigerungsfaktoren von Kreatinin, Bilirubin und Cholinesterase erhöht (Abb. 33). Innerhalb dieser drei Transaminasen mit relevant gesteigerter Volumenaktivität zeigten sich ebenfalls Unterschiede in der Aktivitätssteigerung. So zeigte die GLDH einen um 90,7% signifikant erhöhten Steigerungsfaktor gegenüber der GOT-Zunahme ($p < 0,001$), während die GLDH-Steigerung im Vergleich zur GPT-Zunahme zwar mit 20,6% tendenziell größer ausfiel, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,2277$). Der Steigerungsfaktor der GPT zeigte sich jedoch im Vergleich zu jenem der GOT signifikant um 58,1% erhöht ($p = 0,0023$).

4.1.5 Substratverbrauch von Gpx4

Im weiteren Verlauf erfolgte die Auswertung des intrazellulären Glutathionmetabolismus. Hierbei sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob die Induktion eines Ischämie-Reperfusionsschadens im hepatischen Gewebe eine Auswirkung auf die Aktivierung von Glutathion-Peroxidasen hat und sich somit indirekte Aussagen über die Aktivität der Gpx4 treffen lassen. Der Quotient aus dem Produkt GSSG und dem Substrat GSH beschreibt in

diesem Zusammenhang die Aktivität der Glutathion-Peroxidase (Tab. 9). Zunächst erfolgte analog zu den Voruntersuchungen der Vergleich der unbehandelten Versuchsgruppen nach Induktion eines hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens und nach Scheinoperation, um den singulären Effekt der beschriebenen Operationsmethode darzustellen.

Versuchsgruppen	Intrazellulärer Gehalt ($\mu\text{mol} / \text{g}$) von		Aktivitätsquotient der Glutathionoxidierung (GSSG / GSH)
	GSH	GSSG	
Sham Operation	$6,89 \pm 1,44$	$32,45 \pm 12,65$	$5,19 \pm 1,77$
IRI	$5,98 \pm 0,65$	$27,23 \pm 2,00$	$4,99 \pm 0,68$

Tab. 9: Tabellarische Darstellung des mittels Spektralphotometrie intrazellulär nachgewiesenen Gehalts von reduziertem GSH und oxidiertem GSSG nach Scheinoperation (Sham Operation) und nach Ischämie und Reperfusion (IRI) im Lebergewebe, jeweils ohne medikamentöse Vorbehandlung, in $\mu\text{mol/g}$. Das Verhältnis von GSSG zu GSH ist als versuchsgruppenspezifischer Aktivitätsquotient der Glutathionoxidierung angegeben.

Hierbei zeigte sich, dass sich der errechnete Aktivitätsquotient der Glutathionoxidierung aus oxidiertem GSSG und reduziertem GSH nach IRI-Induktion nicht relevant von jenem nach Scheinoperation unterschied (Abb. 34). Während der Aktivitätsquotient der Glutathion-Peroxidase im scheinoperierten Gewebe bei $5,19 \pm 1,77$ lag, war dieser in der postischämischen Leber mit $4,99 \pm 0,68$ minimal niedriger auszuwerten. Die relative Differenz der Mittelwerte betrug somit 3,9% und war mit einem p-Wert von 0,8987 statistisch nicht signifikant.

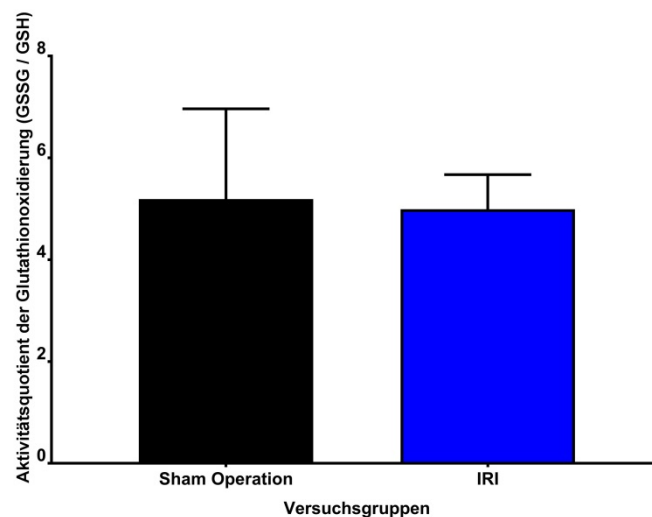


Abb. 34: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten der Glutathionoxidierung aus oxidiertem Glutathion-Disulfid (GSSG) und reduziertem Glutathion (GSH) im explantierten Lebergewebe nach spektralphotometrischer Auswertung in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe (blauer Balken, IRI). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

4.2 Effekte der Baicalein-Vorbehandlung

4.2.1 Kreislaufparameter

Um die Effekte einer Baicalein-Vorbehandlung auf den perioperativen Kreislauf des Versuchstieres zu untersuchen, wurden zunächst die Blutdruck- und Pulscurven der Sham-operierten Mäuse ohne und mit Baicalein-Vorbehandlung miteinander verglichen. Anschließend wurden die unbehandelten und die Baicalein-vorbehandelten Mäuse nach IRI Induktion auf gruppenspezifische Unterschiede untersucht. In diesem Rahmen war ein initialer durchschnittlicher Mitteldruck nach Kanülierung und damit eine halbe Stunde nach intraperitonealer Baicalein-Applikation von 77,3 mmHg zu messen, welcher im Verlauf der Operation auf 82,0 mmHg anstieg (Abb. 35). Nach statistischer Auswertung erwies sich vor allen Dingen der Initial-Mitteldruck bei Kanülierung um 26,3 mmHg als signifikant ($p < 0,001$) geringer als in der unbehandelten Gruppe. Im weiteren Verlauf glichen sich die Druckverläufe wieder einander an. Bei Induktion eines hepatischen IRI war ein ähnliches Blutdruckverhalten zu beobachten. Auch hier konnte ein signifikanter Unterschied von 25,7 mmHg ($p = 0,0303$) zwischen der unbehandelten Versuchsgruppe und der mit Baicalein vorbehandelten Gruppe bezüglich des initialen Mitteldrucks errechnet werden (Abb. 35). Analog zu den Ergebnissen in 4.1.1 konnte auch in der Baicalein-Gruppe nach IRI eine abfallende Blutdrucktendenz von 75 mmHg MAP auf 60,7 mmHg im Verlauf der Operation gemessen werden. Der selbstlimitierende Blutdruckabfall post reperfusionem war hierbei um 14,3 mmHg ebenfalls wieder als signifikant zu beobachten ($p = 0,0218$).

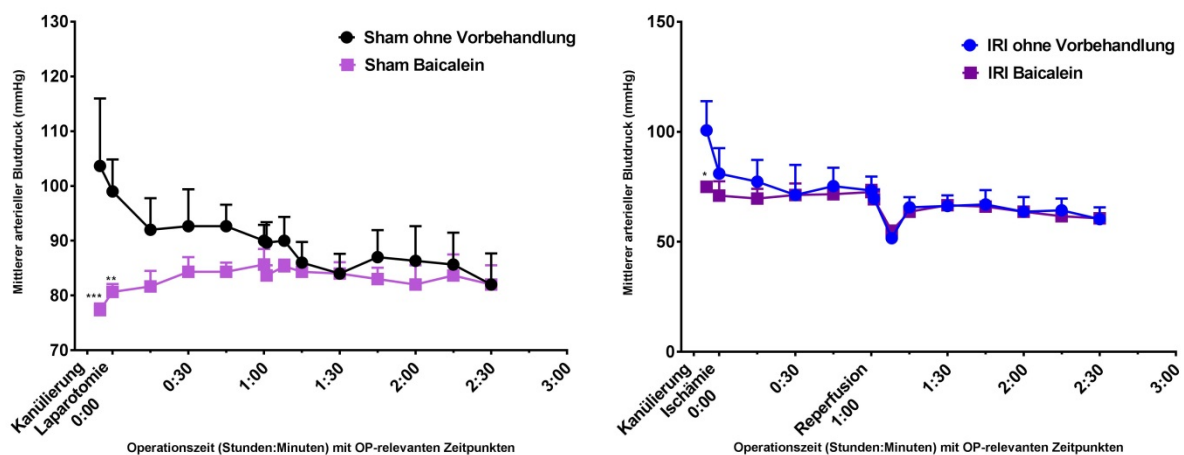


Abb. 35: Graphische Darstellung der Blutdruckkurven der Versuchsgruppen mit Scheinoperation (links) ohne Vorbehandlung (schwarze Kurve, Sham ohne Vorbehandlung) und mit Baicalein-Vorbehandlung (magenta Kurve, Sham Baicalein), sowie mit IRI-Induktion (rechts) ohne Vorbehandlung (blaue Kurve, IRI ohne Vorbehandlung) und mit Baicalein-Vorbehandlung (violette Kurve, IRI Baicalein) im Verlauf des Experiments. Statistik (Šidák-Test): *** entspricht einem p-Wert <

0,001; ** entspricht einem p-Wert < 0,01. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den Kurven zum jeweiligen Zeitpunkt. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Auch nach Baicalein-Vorbehandlung konnte bei den Sham-operierten Mäusen eine Abnahme der Herzfrequenz im Experimentverlauf gemessen werden (Abb. 36). Diese fiel mit einer Pulsreduktion um durchschnittlich 163,4 Schläge pro Minute weitaus deutlicher aus als ohne Vorbehandlung (vgl. 4.1.1). Dies lag vor allen Dingen an der signifikant erhöhten Initialherzfrequenz von durchschnittlich 307,7 bei Kanülierung ($p < 0,01$). Analog zur oben beschriebenen Blutdruckkurve glich sich auch die Herzfrequenz bereits nach 15 Minuten wieder soweit an die Kurve der unbehandelten Sham-Gruppe an, dass kein signifikanter Unterschied mehr zu errechnen war. Dieses Phänomen konnte ebenso zwischen den IRI-Gruppen ohne Vorbehandlung und mit Baicalein-Vorbehandlung beobachtet werden. Auch hier konnte zu Beginn der Operation eine signifikante Pulsdifferenz von 139,0 Schlägen pro Minute gemessen werden ($p < 0,001$), welche sich analog zur Sham-Gruppe im Verlauf des Eingriffes zügig regredient zeigte (Abb. 36).

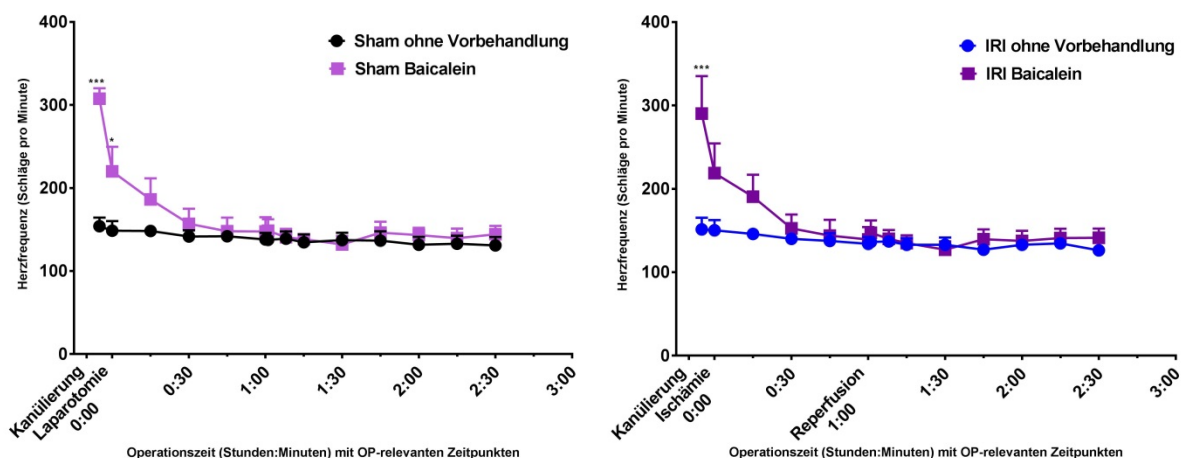


Abb. 36: Graphische Darstellung der Pulskurven der Versuchsgruppen mit Scheinoperation (links) ohne Vorbehandlung (schwarze Kurve, Sham ohne Vorbehandlung) und mit Baicalein-Vorbehandlung (magenta Kurve, Sham Baicalein), sowie mit IRI-Induktion (rechts) ohne Vorbehandlung (blaue Kurve, IRI ohne Vorbehandlung) und mit Baicalein-Vorbehandlung (violette Kurve, IRI Baicalein) im Verlauf des Experiments. Statistik (Šidák-Test): *** entspricht einem p-Wert < 0,001; * entspricht einem p-Wert < 0,05. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den Kurven zum jeweiligen Zeitpunkt. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

4.2.2 Zelltod

Die Baicalein-Vorbehandlung und deren Auswirkungen auf Zelltod wurden im Folgenden untersucht. Hierbei wurden erneut zunächst die scheinooperierte Versuchsgruppe ohne Vorbehandlung mit jener nach Baicalein-Gabe (Abb. 37 links) verglichen. In der Folge wurden die unbehandelten und mit Baicalein vorbehandelten Tiere nach Ischämie und Reperfusion (Abb. 37 rechts) auf den daraufhin entstandenen Schaden miteinander verglichen.

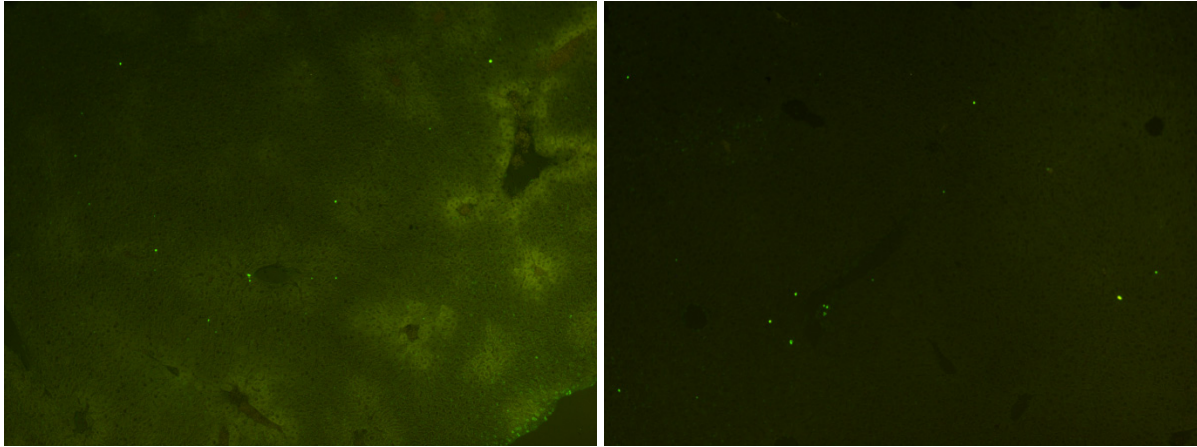


Abb. 37: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Lebergewebeschnitte nach Baicalein-Vorbehandlung nach Scheinoperation (links) und nach Ischämie und Reperfusion (rechts) bei 10x-Vergrößerung und einer Exzitationswellenlänge von 450nm, sowie einer Detektionswellenlänge von 515nm. Fluoreszenzmarkierungen entsprechen abgestorbenen Zellen.

Im entnommenen Lebergewebe der scheinooperierten Mäuse konnte nach beschriebener Baicalein-Vorbehandlung ein Zelltodanteil von $1,15\% \pm 0,16\%$ bezogen auf die Gesamtfläche nachgewiesen werden. Dieser Anteil lag damit signifikant um $0,76\% \pm 0,18\%$ und somit um den Faktor 2,0 höher als in der unbehandelten Sham-Gruppe ($p < 0,001$) (Abb. 38). Allerdings konnte in den Leberlappen, die einen Ischämie-Reperfusionsschaden entwickelten, eine signifikante Zelltodreduktion im Vergleich zur unbehandelten Gruppe festgestellt werden ($p < 0,001$). Da hier nur $4,6\% \pm 0,8\%$ des Lebergewebes vom Zellzerfall betroffen war, entsprach dies einer Reduktion um absolut $8,4\% \pm 2,3\%$ apoptotischer Zellen. Somit verringerte die Vorbehandlung mit Baicalein den hepatischen Zelltod nach Ischämie und Reperfusion um relativ 74,8% im Vergleich zur unbehandelten IRI-Gruppe (Abb. 38).

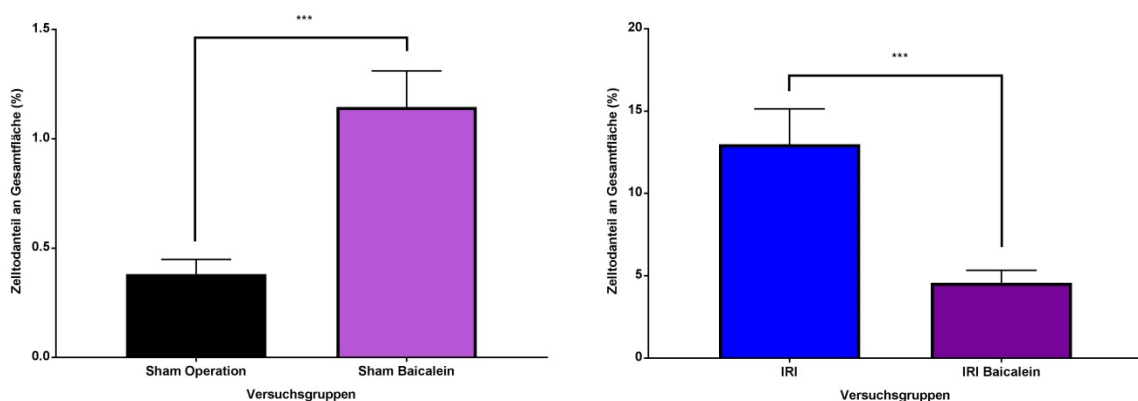


Abb. 38: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Zelltodanalyse im explantierten Lebergewebe mittels TUNEL-Assay in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation (links) ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und mit Baicalein-Vorbehandlung (magenta Balken, Sham Baicalein), sowie nach Ischämie und Reperfusion (rechts) im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach Baicalein-Vorbehandlung (violetter Balken, IRI Baicalein). Statistik (t-Test): *** entspricht einem p-Wert von $< 0,001$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den

markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Die Skalen der Diagramme unterscheiden sich ca. um den Faktor 15.

4.2.3 Proapoptotische Enzyme

Um Rückschlüsse auf potentielle Änderungen der diversen Enzymaktivitäten durch Baicalein-Vorbehandlung ziehen zu können, wurden erneut die Aktivitätsquotienten errechnet und mit denen der unbehandelten Gruppen statistisch verglichen. Dies erfolgte sowohl in den Sham-, als auch in den IRI-Gruppen.

4.2.3.1 ERK1/2

Nach Baicalein-Vorbehandlung ließ sich eine leichte Reduktion des ERK1/2-Aktivitätsquotienten, des Quotienten aus der aktiven, phosphorylierten ERK1/2-Form und der gesamten ERK1/2-Proteinmasse, von $0,085 \pm 0,022$ im unbehandelten Lebergewebe auf $0,063 \pm 0,006$ bei den scheineroperierten Tieren feststellen (Abb. 39). Der Aktivitätsabnahme um 25,5% erwies sich jedoch nicht als statistisch signifikant ($p = 0,3762$).

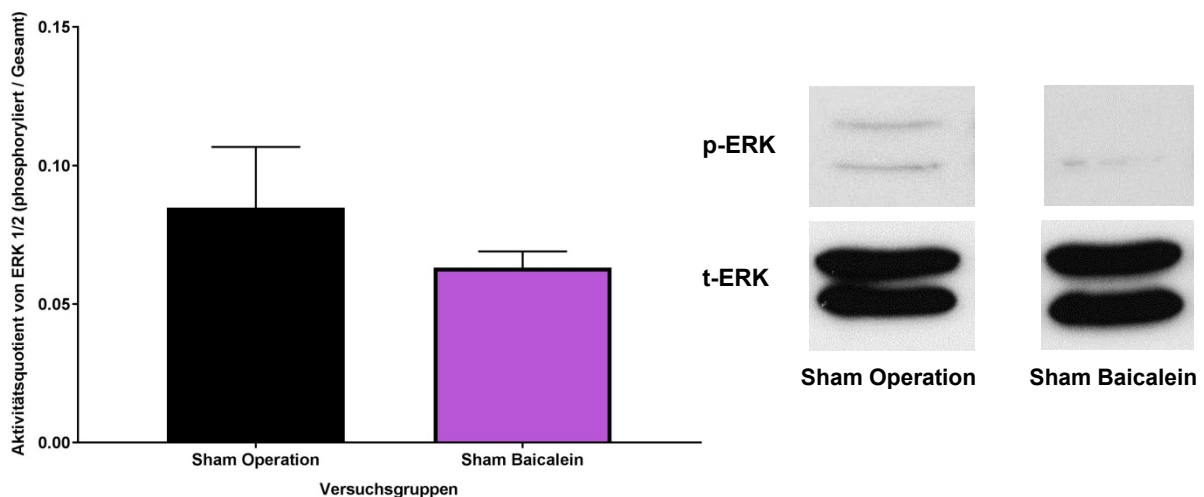


Abb. 39: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 und Gesamt-ERK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach Baicalein-Vorbehandlung (magenta Balken, Sham Baicalein). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 (oben, p-ERK) und Gesamt-ERK (unten, t-ERK) nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (links, Sham Operation) und nach Baicalein-Vorbehandlung (rechts, Sham Baicalein), jeweils bei 42 und 44 kDa.

Auch in der IRI-Gruppe konnte eine leichte, ebenfalls insignifikante Aktivitätsreduktion von ERK1/2 um 36,8% registriert werden ($p=0,3552$) (Abb. 40). Während der Mittelwert des ERK1/2-Aktivitätsquotienten der unbehandelten Tiere nach IRI-Induktion bei $0,51 \pm 0,15$ zu messen war, lag er nach Baicalein-Vorbehandlung lediglich noch bei $0,32 \pm 0,12$.

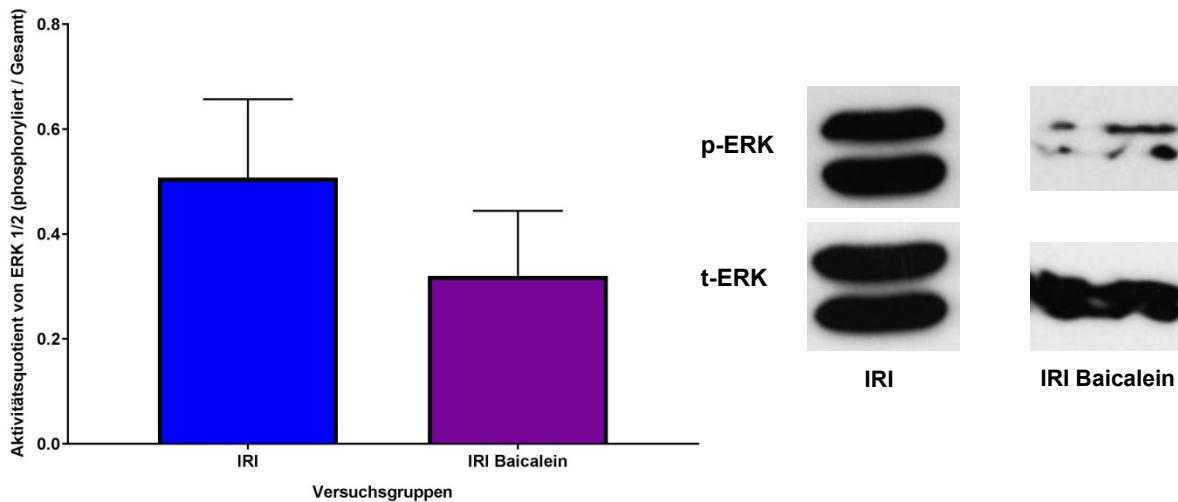


Abb. 40: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 und Gesamt-ERK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach Baicalein-Vorbehandlung (violetter Balken, IRI Baicalein). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 (oben, p-ERK) und Gesamt-ERK (unten, t-ERK) nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (links, IRI) und nach Baicalein-Vorbehandlung (rechts, IRI Baicalein), jeweils bei 42 und 44 kDa.

4.2.3.2 SAPK/JNK

Die Auswertung des SAPK/JNK-Aktivitätsquotienten, welcher sich als Division des phosphorylierten SAPK/JNK-Anteils durch die gesamte SAPK/JNK-Masse errechnen lässt, ergab, dass bereits in der Sham-operierten Gruppe eine signifikante Aktivitätsabnahme von SAPK/JNK nach Baicalein-Vorbehandlung gegenüber der untherapierten Gruppe um 29,5% zu erzielen war ($p = 0,0289$) (Abb. 41). Der Aktivitätsquotient nahm durch die Baicalein-Vorbehandlung von $0,054 \pm 0,005$ auf $0,038 \pm 0,002$ ab.

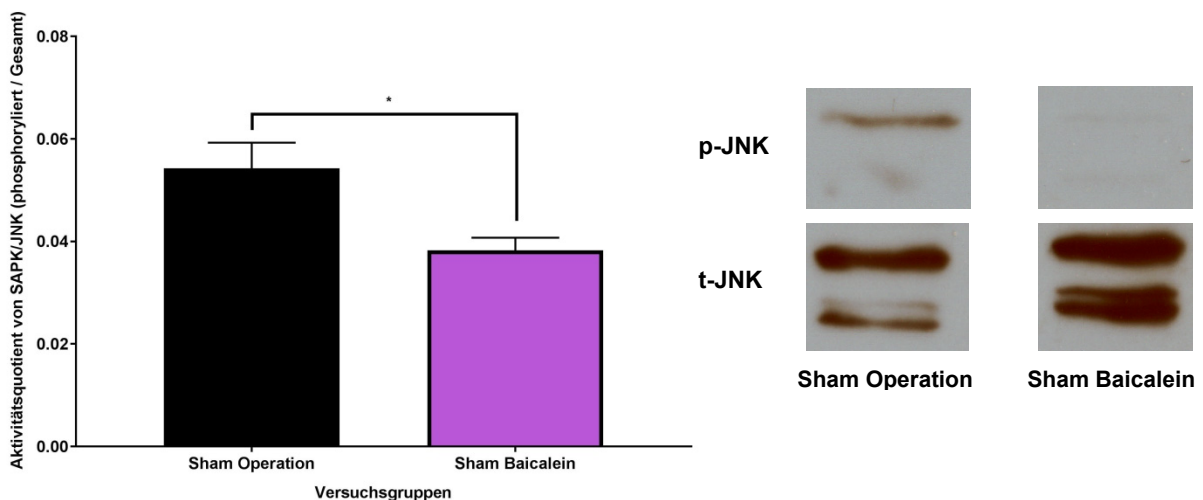


Abb. 41: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK und Gesamt-SAPK/JNK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Schein-

operation ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach Baicalein-Vorbehandlung (magenta Balken, Sham Baicalein). Statistik (t-Test): * entspricht einem p-Wert von $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK (oben, p-JNK) und Gesamt-SAPK/JNK (unten, t-JNK) nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (links, Sham Operation) und nach Baicalein-Vorbehandlung (rechts, Sham Baicalein), jeweils bei 46 und 54 kDa.

Dieser Effekt konnte nach Induktion des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens noch deutlich gesteigert werden. Während der SAPK/JNK-Aktivitätsquotient im postischämischen Lebergewebe noch mit $0,89 \pm 0,20$ in der untherapierten Gruppe gemessen wurde, zeigte die Baicalein-vorbehandelte Gruppe mit $0,15 \pm 0,11$ eine deutlich reduzierte SAPK/JNK-Aktivität (Abb. 42). So konnte die Aktivität von SAPK/JNK nach Baicalein-Vorbehandlung in der IRI-Gruppe um 83,0% signifikant reduziert werden ($p = 0,0068$).

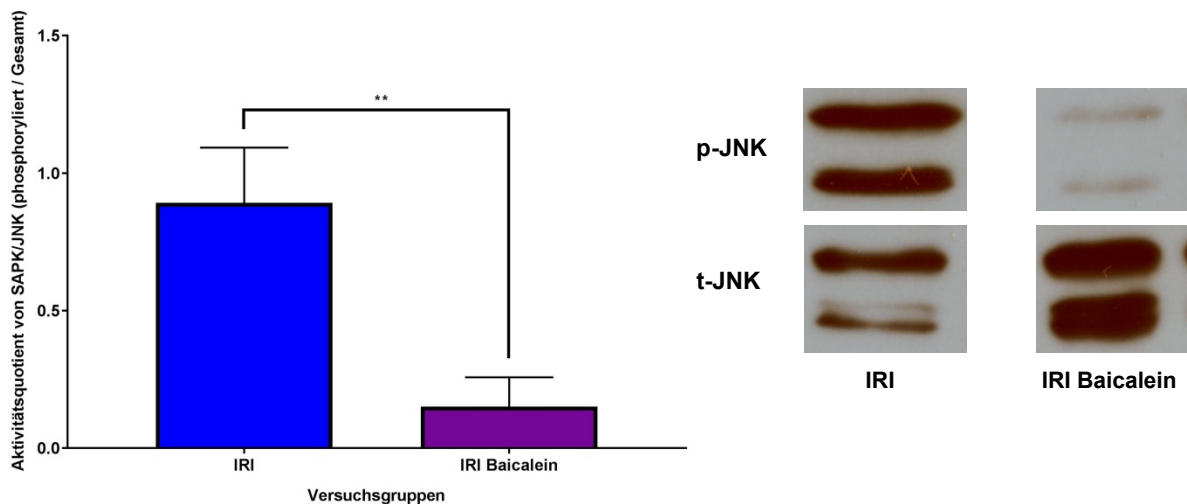


Abb. 42: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK und Gesamt-SAPK/JNK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach Baicalein-Vorbehandlung (violetter Balken, IRI Baicalein). Statistik (t-Test): ** entspricht einem p-Wert von $< 0,01$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK (oben, p-JNK) und Gesamt-SAPK/JNK (unten, t-JNK) nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (links, IRI) und nach Baicalein-Vorbehandlung (rechts, IRI Baicalein), jeweils bei 46 und 54 kDa.

4.2.3.3 Caspase-3

Der Aktivitätsquotient aus aktivierter Caspase-3 und der Ladekontrolle GAPDH unterschied sich nach Baicalein-Gabe mit $0,055 \pm 0,005$ nur marginal von jenem der untherapierten Gruppe mit $0,061 \pm 0,009$ (Abb. 43). Dies entsprach einer insignifikanten Aktivitätsreduktion um 11,0 % ($p = 0,5297$).

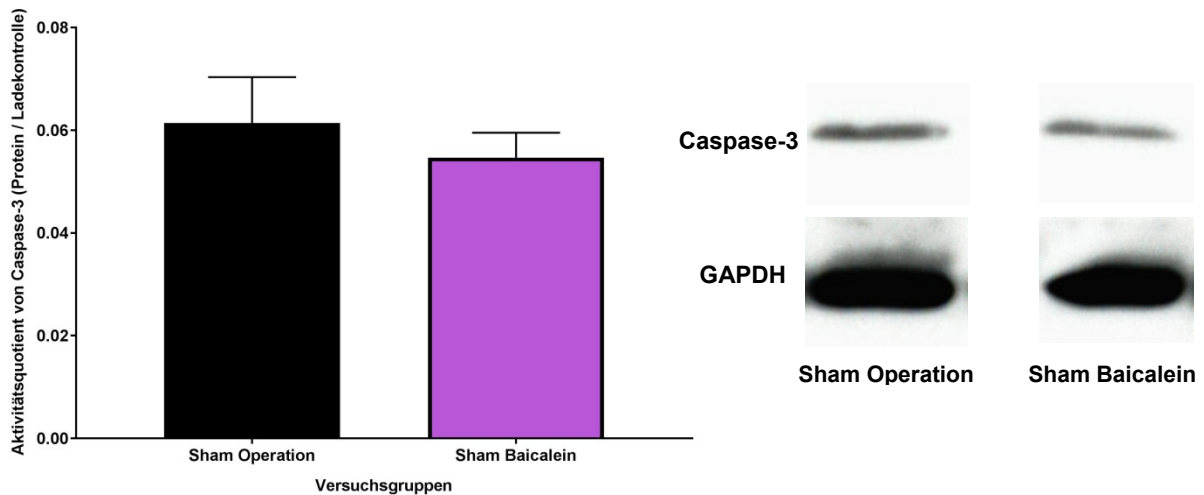


Abb. 43: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter Caspase-3 und deren Ladekontrolle GAPDH im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach Baicalein-Vorbehandlung (magenta Balken, Sham Baicalein). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter Caspase-3 (oben, Caspase-3) und deren Ladekontrolle (unten, GAPDH) nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (links, Sham Operation) und nach Baicalein-Vorbehandlung (rechts, Sham Baicalein), jeweils bei 19 kDa (Caspase-3) und 37 kDa (GAPDH).

Allerdings zeigte sich auch im Aktivitätsniveau der Caspase-3 eine signifikante Abnahme um 45,0 % nach Baicalein-Vorbehandlung in den Ischämie-Reperfusions-geschädigten Leberlap-pen im Vergleich zur unbehandelten Gruppe ($p < 0,001$) (Abb. 44). Während der Aktivitätsquotient der Caspase-3 in der unbehandelten IRI-Gruppe bei $0,75 \pm 0,04$ lag, konnte dieser nach Baicalein-Vorbehandlung nur noch mit $0,41 \pm 0,06$ gemessen werden.

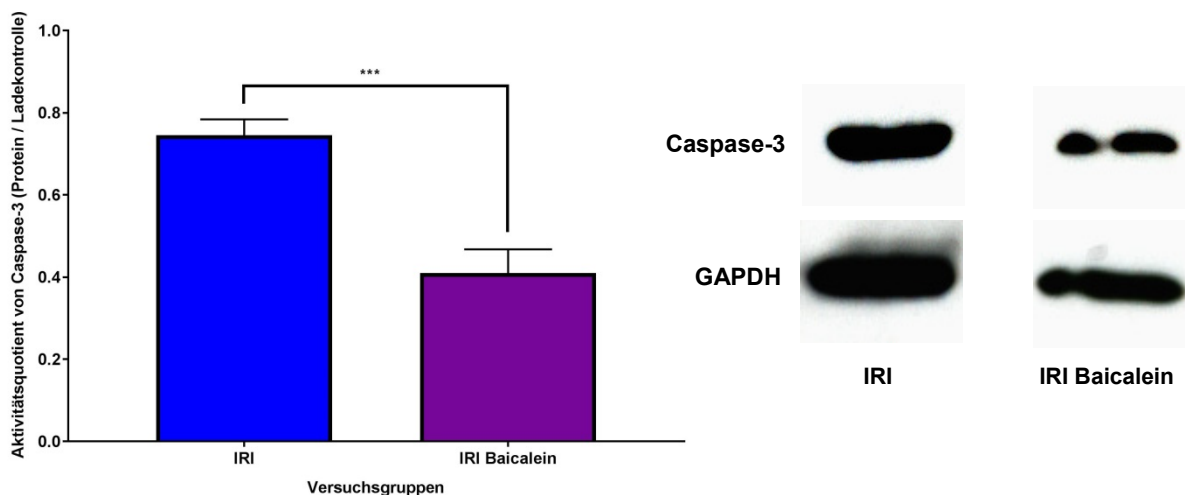


Abb. 44: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter Caspase-3 und deren Ladekontrolle GAPDH im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Re-perfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach Baicalein-Vorbehandlung (violetter Balken, IRI Baicalein). Statistik (t-Test): *** entspricht einem p-Wert von $< 0,001$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter Caspase-3 (oben, Caspase-3) und deren Ladekontrolle

(unten, GAPDH) nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (links, IRI) und nach Baicalein-Vorbehandlung (rechts, IRI Baicalein), jeweils bei 19 kDa (Caspase-3) und 37 kDa (GAPDH).

4.2.3.4 PARP

Der Effekt einer Baicalein-Vorbehandlung bei den scheinooperierten-Mäusen auf das Aktivitätsprofil der PARP erbrachte mit einer Aktivitätsabnahme um 7,8% keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,5686$) (Abb. 45). Der Quotient aus aktiver, gespaltenen PARP und der gesamten PARP-Proteinmasse unterschied sich mit $0,082 \pm 0,008$ bei den unbehandelten Tieren und $0,075 \pm 0,007$ bei Baicalein-Vorbehandlung nur unwesentlich.

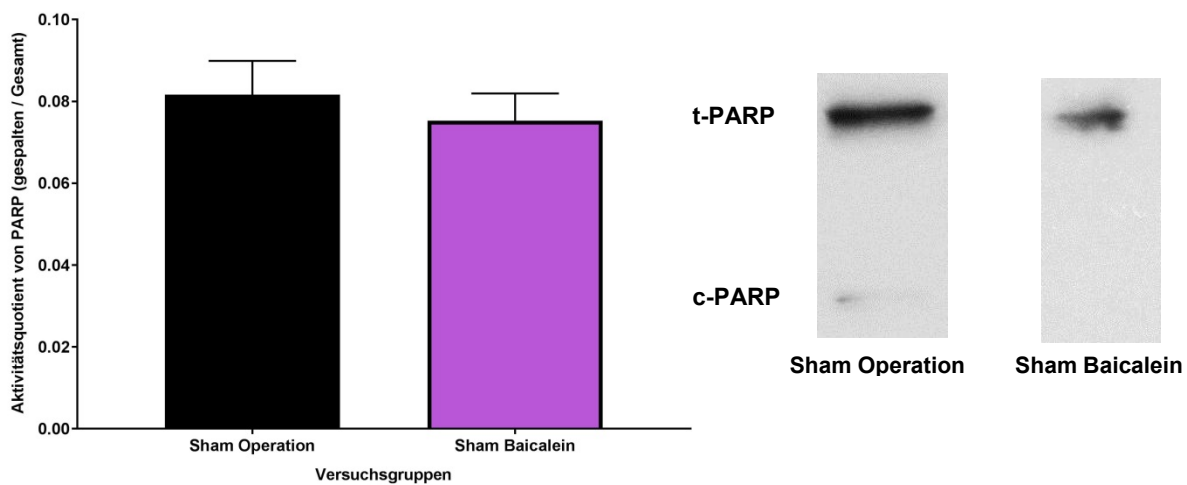


Abb. 45: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, gespaltenen PARP und Gesamt-PARP im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach Baicalein-Vorbehandlung (magenta Balken, Sham Baicalein). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, gespaltenen PARP (unten, c-PARP) und Gesamt-PARP (oben, t-PARP) nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (links, Sham Operation) und nach Baicalein-Vorbehandlung (rechts, Sham Baicalein), jeweils bei 89 kDa (c-PARP) und 116 kDa (t-PARP).

Hingegen konnte nach Untersuchung der postischämisch geschädigten Leberlappen festgestellt werden, dass eine Baicalein-Vorbehandlung zu einer signifikanten PARP-Aktivitätsreduktion im hepatischen IRI um 73,8% gegenüber der unbehandelten IRI-Gruppe führt (Abb. 46). Hierbei sank der PARP-Aktivitätsquotient von $0,66 \pm 0,18$ bei den untherapierten Tieren auf $0,17 \pm 0,04$ ab ($p = 0,0224$).

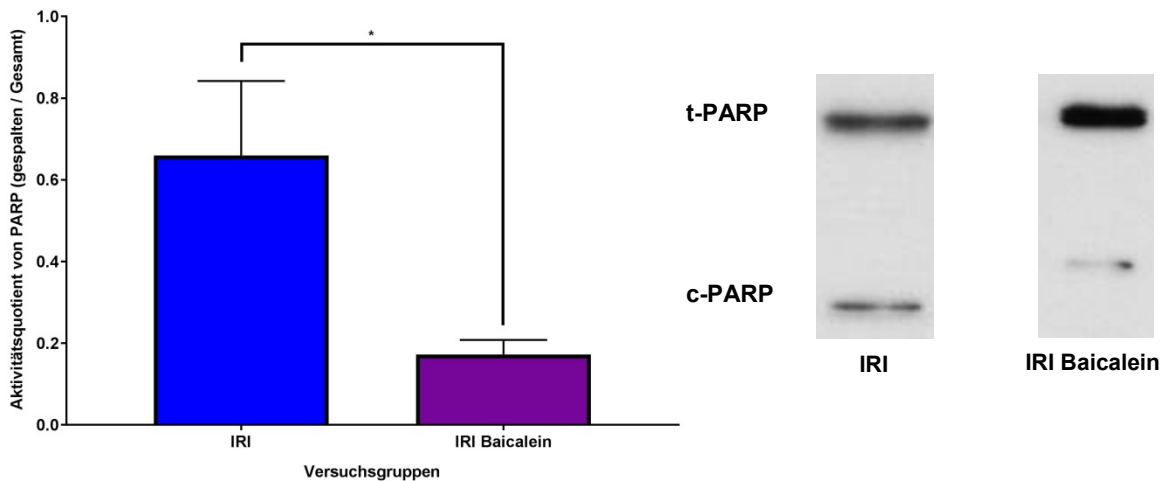


Abb. 46: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, gespaltenen PARP und Gesamt-PARP im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach Baicalein-Vorbehandlung (violetter Balken, IRI Baicalein). Statistik (t-Test): * entspricht einem p-Wert von < 0,05. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, gespaltenen PARP (unten, c-PARP) und Gesamt-PARP (oben, t-PARP) nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (links, IRI) und nach Baicalein-Vorbehandlung (rechts, IRI Baicalein), jeweils bei 89 kDa (c-PARP) und 116 kDa (t-PARP).

4.2.4 Alteration der Serum-Leberwertkonzentrationen

Auch in der Analyse der laborchemisch untersuchten Serumparameter wurde zunächst der endogene Effekt einer Baicalein-Vorbehandlung auf das Versuchstier und deren Auswirkungen auf die Blutwerte nach Scheinoperation untersucht (Tab. 10). Da die hieraus resultierenden Enzymaktivitätssteigerungen auf die alleinige Medikamentengabe zurückzuführen waren, wurden sie im weiteren Verlauf als toxischer Faktor des entsprechenden Medikaments, in diesem Fall Baicalein, für den jeweiligen Laborwert bezeichnet. Hierbei konnte zunächst beobachtet werden, dass die präoperative Gabe von Baicalein keine signifikanten oder relevanten Auswirkungen auf die Konzentration von Kreatinin oder Bilirubin zu haben scheint. Jedoch konnte eine signifikante Zunahme der Lebersyntheseleistung ($p = 0,0319$) in der scheinoperierten und mit Baicalein vorbehandelten Gruppe von $22,6\% \pm 4,1\%$ in Bezug auf die Volumenaktivität der Cholinesterase (ChE) festgestellt werden. Des Weiteren konnten deutliche Steigerungen der Volumenaktivitäten der GOT, der GPT und der GLDH gemessen werden (Abb. 47). So konnte die Aktivität der GPT nach Baicalein-Behandlung, verglichen mit der Versuchsgruppe ohne medikamentöse Vorbehandlung, im Sinne eines positiven Regulationstrends um $100,8\% \pm 34,1\%$ gesteigert gemessen werden, wenngleich ohne statistische Signifikanz ($p = 0,1896$). Im Gegensatz hierzu präsentierte sich der Effekt einer Baicalein-Gabe in Bezug auf die Aktivität der GOT mit einer Steigerung um $312,5\% \pm 35,4\%$ ge-

genüber den unbehandelten Versuchstieren deutlich ausgeprägter und statistisch signifikant ($p < 0,001$). Die Aktivität der GLDH wurde ebenfalls in der Baicalein-Therapiegruppe um $519,0\% \pm 74,1\%$ gesteigert. Auch diese Differenz erzielte mit einem p-Wert von 0,0128 statistische Signifikanz.

Laborchemisch untersuchte Serumparameter	Versuchsgruppen						Steigerungsfaktor von Baicalein nach IRI-Induktion
	Sham Operation			IRI			
	Ohne Vor- behandlung	Baicalein	Toxischer Faktor Baicalein	Ohne Vor- behandlung	Baicalein	Toxischer Faktor Baicalein	
Kreatinin (mg/dl)	0,8 ± 0	0,8 ± 0	0% ± 0%	0,8 ± 0	0,8 ± 0	0% ± 0%	0%
Bilirubin (mg/dl)	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,2	+11,1% ± 12,4%	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,1	+20,4% ± 7,5%	+30,0% ± 7,9%
GOT (U/l)	152,0 ± 34,3	627,0 ± 102,0	+312,5% ± 35,4% (***)	794,0 ± 213,9	1780,5 ± 455,7	+124,2% ± 22,4% (*)	+184,0% ± 26,3%
GPT (U/l)	121,0 ± 26,5	243,0 ± 78,1	+100,8% ± 34,1%	928,9 ± 316,9	1593,1 ± 626,9	+71,5% ± 28,6%	+555,6% ± 98,3% (*)
GLDH (U/l)	14,5 ± 3,9	89,8 ± 21,1	+519,0% ± 74,1% (*)	131,3 ± 25,7	363,8 ± 132,9	+177,1% ± 36,4%	+305,3% ± 53,0%
ChE (kU/l)	2,9 ± 0,1	3,5 ± 0,2	+22,6% ± 4,1% (*)	2,9 ± 0,1	3,3 ± 0,2	+13,6% ± 2,3% (*)	-6,7% ± 2,7%

Tab. 10: Tabellarische Darstellung der Konzentrationen (für Kreatinin und Bilirubin) und Volumenaktivitäten (für GOT, GPT, GLDH & ChE) laborchemisch untersuchter Parameter nach Scheinoperation (Sham Operation) und nach Ischämie und Reperfusion (IRI) im Serum, jeweils ohne medikamentöse Vorbehandlung und nach Baicalein-Vorbehandlung. Die relative Differenz nach Baicalein-Vorbehandlung zu keiner Vorbehandlung ist als parameterspezifischer toxischer Faktor angegeben, jeweils pro Versuchsgruppe. Die relative Differenz nach Induktion eines Ischämie-Reperfusionsschadens und nach Baicalein-Vorbehandlung zur Scheinoperation nach Baicalein-Vorbehandlung ist als parameterspezifischer Steigerungsfaktor von Baicalein angegeben. Statistik (t-Test; Šidák-Test): *** entspricht einem p-Wert $< 0,001$; * entspricht einem p-Wert $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf die durch die parameterspezifischen toxischen Faktoren bzw. Steigerungsfaktoren dargestellten Unterschiede. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Im weiteren Verlauf erfolgte die Untersuchung der Konzentrations- und Enzymaktivitätsunterschiede zwischen der Baicalein-Therapiegruppe und den unbehandelten Versuchstieren nach Induktion des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens, und somit der toxischen Faktoren von Baicalein in der IRI-Gruppe (Tab. 10). Auch im Rahmen dieser Analyse zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für die Laborwerte Kreatinin und Bilirubin (Abb. 47). Jedoch zeigten sich erneut deutlich gesteigerte toxische Faktoren der GOT, GPT und GLDH. Während die Volumenaktivität der GPT um $71,5\% \pm 28,6\%$ nach Baicalein-Vorbehandlung gegenüber keiner medikamentösen Behandlung gesteigert gemessen wurde ($p = 0,2451$), lag dieser toxische Faktor für die GLDH sogar bei $+177,1\% \pm 36,4\%$ ($p = 0,0736$). Diese Ergebnisse waren nur als Trends zu werten, da sie keine statistische Signifikanz erzielten. Der Baicalein-spezifische toxische Faktor für die GOT nach IRI-Induktion war mit $+124,2\% \pm 22,4\%$ und einem p-Wert von 0,0188 statistisch signifikant. Ebenso war erneut eine signifikante Steigerung der ChE um $13,6\% \pm 2,3\%$ zu messen ($p = 0,0389$).

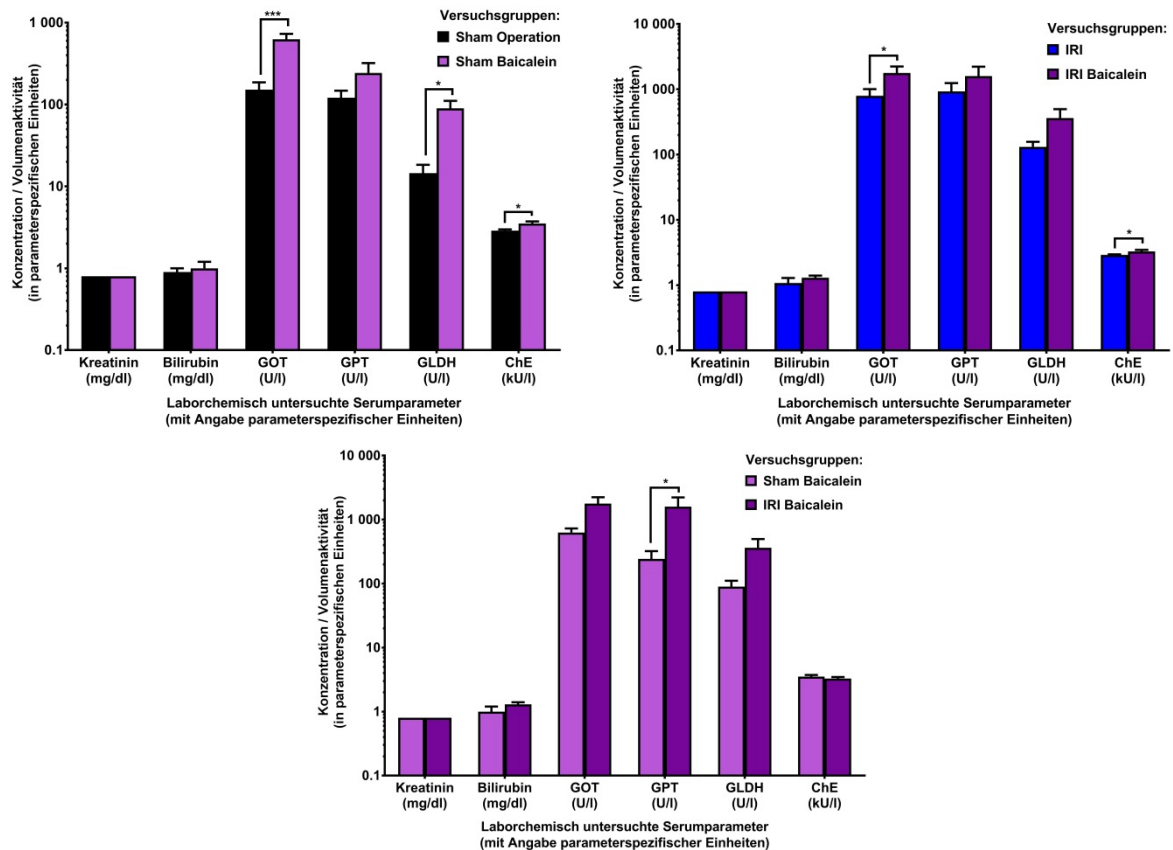


Abb. 47: Graphische, logarithmische Darstellungen der Konzentrationen (für Kreatinin und Bilirubin) und Volumenaktivitäten (für GOT, GPT, GLDH & ChE) laborchemisch untersuchter Parameter nach Scheinoperation (oben links) ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und mit Baicalein-Vorbehandlung (magenta Balken, Sham Baicalein), sowie nach Ischämie und Reperfusion (oben rechts) ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach Baicalein-Vorbehandlung (violetter Balken, IRI Baicalein) im Serum, sowie (unten) nach Scheinoperation (magenta Balken, Sham Baicalein) und nach Ischämie und Reperfusion (violetter Balken, IRI Baicalein), jeweils nach Baicalein-Vorbehandlung. Die parameterspezifischen Einheiten sind in der X-Achsen-Beschriftung angegeben. Statistik (t-Test; Šidák-Test): *** entspricht einem p-Wert von < 0,001; * entspricht einem p-Wert < 0,05. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Um nun darstellen zu können, in wie weit sich eine spezifische medikamentöse Therapie, in diesem Fall Baicalein, auf die Effekte einer dezidierten operative Behandlung, in diesem Fall die Erzeugung eines hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens, auswirkt, war die Bildung des therapiespezifischen Steigerungsfaktor für die jeweiligen Laborparameter notwendig (Tab. 10; vgl. 4.1.4). Hierzu wurden zunächst die Konzentrationen und Volumenaktivitäten der beschriebenen Serumparameter nach Ischämie und Reperfusion und Baicalein-Vorbehandlung mit jenen verglichen, die nach der Scheinoperation und Baicalein-Vorbehandlung erhoben wurden (Abb. 47). Hierbei zeigten sich keine relevanten oder signifikanten Unterschiede bei der Untersuchung von Kreatinin, Bilirubin oder ChE. Allerdings fand sich erneut ein tendenzieller, wenn auch insignifikanter, Enzymanstieg nach Ischämie und Reperfusion für GOT um $184,0\% \pm 26,3\%$ ($p = 0,1129$) und GLDH um $305,3\% \pm 53,0\%$ ($p = 0,1863$). Dieser Baicalein-spezifische Steigerungsfaktor zwischen Ischämie-Reperfusionsschaden und Schein-

operation betrug für die GPT sogar $+555,6\% \pm 98,3\%$ und war statistisch signifikant ($p = 0,0201$). Diese medikamentenspezifischen Steigerungsfaktoren konnten im Weiteren nun mit den in 4.1.4 errechneten Steigerungsfaktoren der unbehandelten Versuchsgruppen verglichen werden (Abb. 48). Hierbei zeigten sich, analog zu den Voruntersuchungen, keine relevanten Differenzen in der Ausprägung der Steigerungsfaktoren für Kreatinin, Bilirubin und ChE. Jedoch konnte eine relative Abnahme des Steigerungsfaktors der GPT nach Baicalein-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Gruppe um $16,8\% \pm 5,9\%$ festgestellt werden, wenngleich insignifikant ($p = 0,3072$). Statistisch hochsignifikant präsentierte sich im Vergleich hierzu die relative Reduktion des Steigerungsfaktors nach Baicalein-Vorbehandlung für GOT und GLDH (jeweils $p < 0,001$). Der Steigerungsfaktor für GOT lag nach Baicalein-Gabe $56,4\% \pm 4,0\%$ niedriger als bei den unbehandelten Versuchstieren, für die GLDH lag der Baicalein-spezifische Steigerungsfaktor sogar $62,1\% \pm 2,9\%$ niedriger. Die relativen Differenzen der verglichenen Steigerungsdifferenzen von Baicalein- und keiner Vorbehandlung konnten daher als relative Steigerungsfaktoren nach Baicalein-Vorbehandlung laborparameterspezifisch verglichen werden (Abb. 48). Dies erfolgte aufgrund der bisher dargestellten Relevanz lediglich für die Parameter der Leberzellschädigung. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der Enzymwerterhöhung nach Ischämie und Reperfusion und Baicalein-Vorbehandlung im Vergleich zur unbehandelten Versuchsgruppe hochsignifikant stärker für GOT und GLDH ausfiel als für GPT (jeweils $p < 0,001$). Somit führte die Baicalein-Vorbehandlung in der Analyse von GOT, GPT und GLDH zu einer deutlich erniedrigten Enzymwertwerterhöhung nach IRI-Induktion, signifikanterweise für GOT und GLDH.

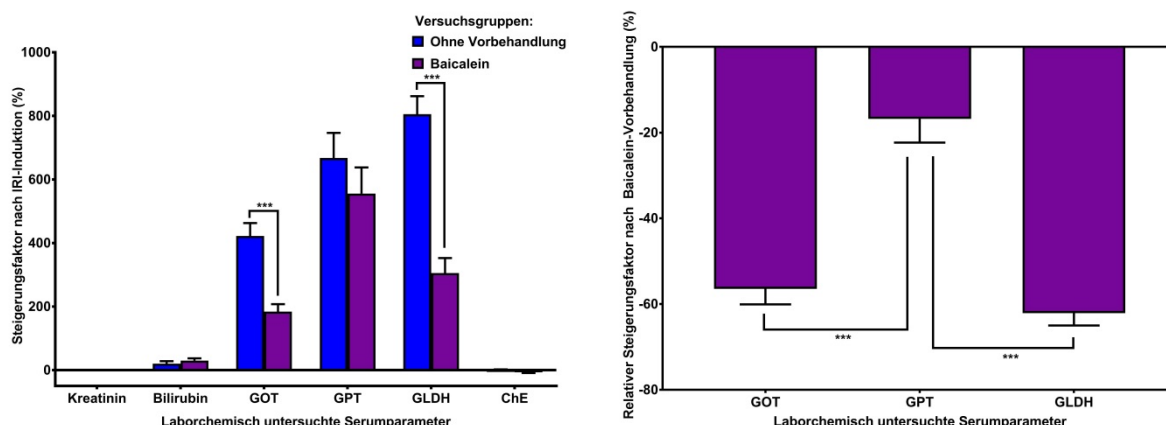


Abb. 48: Links: Graphische Darstellung der parameterspezifischen Steigerungsfaktoren der jeweiligen laborchemisch untersuchten Serumparmeter nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zur Scheinoperation, jeweils ohne Vorbehandlung (blauer Balken, ohne Vorbehandlung) und mit Baicalein-Vorbehandlung (violetter Balken, Baicalein). Rechts: Graphische Darstellung der parameterspezifischen relativen Steigerungsfaktoren nach Baicalein-Vorbehandlung der jeweiligen laborchemisch untersuchten Serumparmeter als relativer Unterschied der jeweiligen Steigerungsfaktoren nach Bai-

caicin-Vorbehandlung im Vergleich zu keiner Vorbehandlung. Statistik (Šidák-Test; Tukey-Test): *** entspricht einem p-Wert von < 0,001. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

4.2.5 Substratverbrauch von Gpx4

Im Weiteren erfolgte die Auswertung der Auswirkungen einer Baicalein-Behandlung auf den Glutathion-Metabolismus im explantierten Lebergewebe (Tab. 11).

Versuchsgruppen	Intrazellulärer Gehalt ($\mu\text{mol} / \text{g}$) von		Aktivitätsquotient der Glutathionoxidierung (GSSG / GSH)
	GSH	GSSG	
Sham Operation	$6,89 \pm 1,44$	$32,45 \pm 12,65$	$5,19 \pm 1,77$
Sham Baicalein	$4,79 \pm 0,45$	$29,89 \pm 6,55$	$6,10 \pm 1,04$
IRI	$5,98 \pm 0,65$	$27,23 \pm 2,00$	$4,99 \pm 0,68$
IRI Baicalein	$4,82 \pm 0,70$	$33,29 \pm 3,93$	$7,27 \pm 0,68$

Tab. 11: Tabellarische Darstellung des mittels Spektralphotometrie intrazellulär nachgewiesenen Gehalts von reduziertem GSH und oxidiertem GSSG nach Scheinoperation (Sham (Operation)) und nach Ischämie und Reperfusion (IRI) im Lebergewebe, jeweils ohne medikamentöse Vorbehandlung und nach Baicalein-Vorbehandlung, in $\mu\text{mol/g}$. Das Verhältnis von GSSG zu GSH ist als versuchsgruppenspezifischer Aktivitätsquotient der Glutathionoxidierung angegeben.

Zunächst wurde der alleinige Effekt der Baicalein-Vorbehandlung auf die Glutathionoxidierung im scheinooperierten Lebergewebe analysiert. Hierzu wurden die Aktivitätsquotienten der scheinooperierten Tiere, die mit Baicalein therapiert wurden, mit jenen ohne Vorbehandlung verglichen (Abb. 49). Hierbei zeigte sich, dass die Baicalein-Vorbehandlung bereits in der Sham-operierten Gruppe zu einer diskreten Steigerung des Aktivitätsquotienten des Glutathionmetabolismus' um 17,5% von $5,19 \pm 1,77$ in der unbehandelten Gruppe auf $6,10 \pm 1,04$ zur Folge hatte. Allerdings konnte für dieses Ergebnis keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden ($p = 0,6741$).

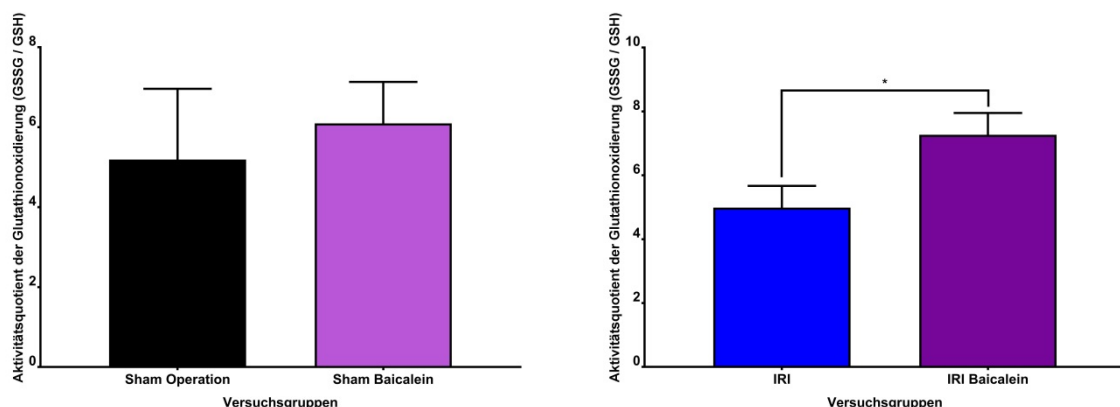


Abb. 49: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten der Glutathionoxidierung aus oxidiertem Glutathion-Disulfid (GSSG) und reduziertem Glutathion (GSH) im explantierten Lebergewebe nach spektralphotometrischer Auswertung in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation (links) ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und mit Baicalein-Vorbehandlung (magenta Balken, Sham Baicalein), sowie nach Ischämie und Reperfusion (rechts) im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach Baicalein-Vorbehandlung (violetter Balken, IRI Baicalein). Statistik (t-

Test): * entspricht einem p-Wert von $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Statistisch signifikant präsentierte sich im Unterschied hierzu diese Differenz nach Ischämie und Reperfusion ($p = 0,0329$). Im Rahmen der Evaluation des Baicalein-Effektes auf den Glutathion-Stoffwechsel im postischämischen Gewebe betrug der Aktivitätsquotient der unbehandelten Versuchsgruppe $4,99 \pm 0,68$, während in der Baicalein-Gruppe ein Wert von $7,27 \pm 0,68$ errechnet werden konnte. Dies entsprach einer Steigerung der Glutathionoxidierung um 45,7%, die durch die Baicalein-Vorbehandlung hervorgerufen wurde (Abb. 49).

4.3 Effekte der DMSO-Vorbehandlung

4.3.1 Kreislaufparameter

Die kreislaufwirksamen Effekte, die durch die alleinige DMSO-Vorbehandlung ausgelöst wurden, wurden ebenfalls in der Art und Weise untersucht, dass zunächst die scheinooperierten Tiere nach DMSO-Vorbehandlung mit denen ohne Vorbehandlung hinsichtlich des arteriellen Mitteldrucks und der Herzfrequenz verglichen wurden. Von einem Mitteldruck von 69,0 mmHg zum Zeitpunkt der Kanülierung stieg der Blutdruck im Verlauf der Operation auf 77,7 mmHg an (Abb. 50). Auch hierbei war festzustellen, dass vor allem zu Beginn des Experiments signifikant niedrigere Mitteldruckwerte zu messen waren. So lag beispielsweise der Kanülierungsmitteldruck mit 69,0 mmHg um 34,7 mmHg signifikant unterhalb des Kanülierungsdrucks der unbehandelten Sham-Gruppe ($p < 0,001$). Auch der Blutdruck der scheinooperierten DMSO-Gruppe glich sich im Verlauf wieder dem Mitteldruck der unbehandelten Gruppe an, allerdings waren hierbei erst nach 65 Minuten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mehr darstellbar ($p > 0,05$). Dennoch konnte beobachtet werden, dass die Blutdruckmittelwerte der DMSO-Gruppe auch im weiteren Verlauf stets geringer waren als die der DMSO-Gruppe, wenn auch nicht signifikant.

Auch in der IRI-Versuchsgruppe nach DMSO-Gabe konnte festgehalten werden, dass mit 66,0 mmHg bei Kanülierung initial ein um 34,6 mmHg signifikant niedrigerer Blutdruck zu messen war als bei den unbehandelten Tieren ($p < 0,001$) (Abb. 50). Analog zu den Ergebnissen der Baicalein-Gruppe mit hepatischem IRI (vgl. 4.2.1), glich sich die Blutdruckkurve bereits 15 Minuten nach Ischämieinduktion der Kurve der unbehandelten Tiere derart an, dass kein signifikanter Unterschied mehr festzustellen war. Der Postreperfusionsabfall des Blutdruckes

um 16,3 mmHg konnte erneut als signifikant ($p = 0,0478$) beobachtet werden und präsentierte sich analog zu den anderen IRI-Versuchsgruppen selbstlimiterend.

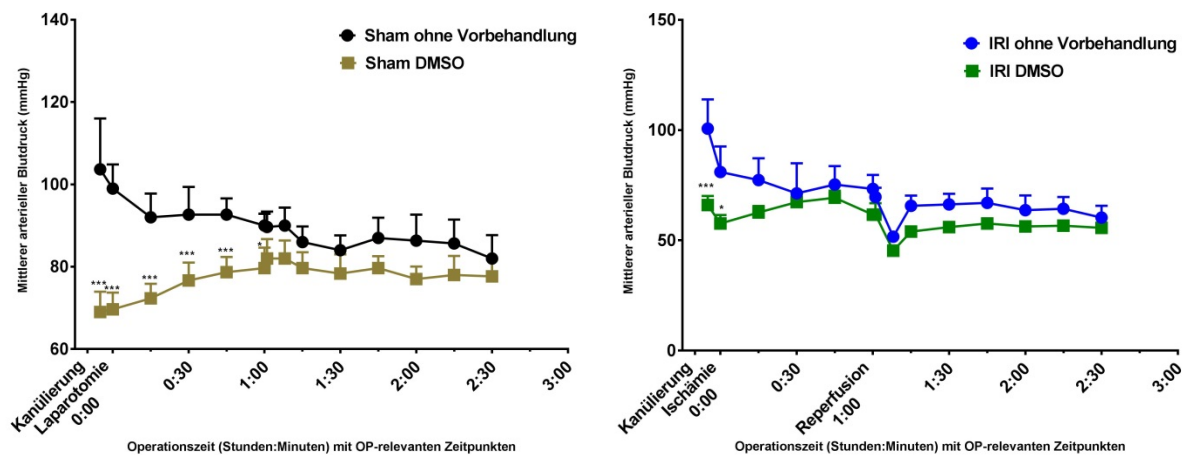


Abb. 50: Graphische Darstellung der Blutdruckkurven der Versuchsgruppen mit Scheinoperation (links) ohne Vorbehandlung (schwarze Kurve, Sham ohne Vorbehandlung) und mit DMSO-Vorbehandlung (goldene Kurve, Sham DMSO), sowie mit IRI-Induktion (rechts) ohne Vorbehandlung (blaue Kurve, IRI ohne Vorbehandlung) und mit DMSO-Vorbehandlung (grüne Kurve, IRI DMSO) im Verlauf des Experiments. Statistik (Šidák-Test): *** entspricht einem p -Wert $< 0,001$; * entspricht einem p -Wert $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den Kurven zum jeweiligen Zeitpunkt. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Die gemessene Herzfrequenz der scheineroperierten Tiere lag mit 282,7 nach DMSO-Gabe zum Zeitpunkt der Kanülierung um 128,7 Schläge pro Minute signifikant höher als ohne Vorbehandlung ($p < 0,001$) (Abb. 51). Dies hatte zur Folge, dass eine deutliche Pulsabnahme um durchschnittlich 151 Schläge pro Minute im Verlauf des Experiments festzustellen war. Ebenso wie in der Baicalein-Gruppe beobachtet, erreichte die scheineroperierte und mit DMSO vorbehandelte Versuchsgruppe 15 Minuten nach Laparotomie keine signifikant veränderten Herzfrequenzen im Vergleich zur unbehandelten Sham-Gruppe.

Ein vergleichbares Pulsverhalten zeigten die Versuchstiere der IRI-Gruppe nach DMSO-Gabe. Auch hier war eine signifikante Pulserhöhung um durchschnittlich 124 Schläge pro Minute im Vergleich zur unbehandelten IRI-Gruppe zu beobachten ($p < 0,001$). Vergleichbar mit den scheineroperierten Tieren war auch bei den Mäusen mit IRI-Induktion ein rascher Abstieg der Herzfrequenz zu beobachten, so dass bereits kurz nach Ischämie der entsprechenden Leberlappen kein signifikanter Unterschied zwischen den Pulskurven der DMSO- und der unbehandelten Gruppe zu verzeichnen war (Abb. 51).

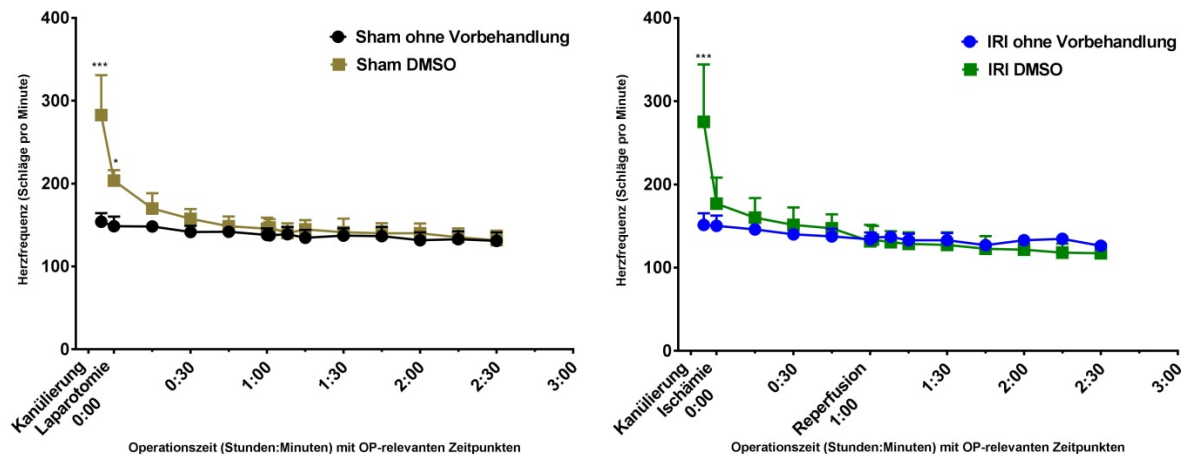


Abb. 51: Graphische Darstellung der Pulskurven der Versuchsgruppen mit Scheinoperation (links) ohne Vorbehandlung (schwarze Kurve, Sham ohne Vorbehandlung) und mit DMSO-Vorbehandlung (goldene Kurve, Sham DMSO), sowie mit IRI-Induktion (rechts) ohne Vorbehandlung (blaue Kurve, IRI ohne Vorbehandlung) und mit DMSO-Vorbehandlung (grüne Kurve, IRI DMSO) im Verlauf des Experiments. Statistik (Šidák-Test): *** entspricht einem p-Wert < 0,001; * entspricht einem p-Wert < 0,05. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den Kurven zum jeweiligen Zeitpunkt. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

4.3.2 Zelltod

Auch nach alleiniger DMSO-Vorbehandlung erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Lebergewebes bezüglich des Zelltods. Erneut wurden sowohl die unbehandelte mit der DMSO-behandelten Shamgruppe (Abb. 52 links), als auch die unbehandelte mit der DMSO-vorbehandelten IRI-Gruppe (Abb. 52 rechts) verglichen.

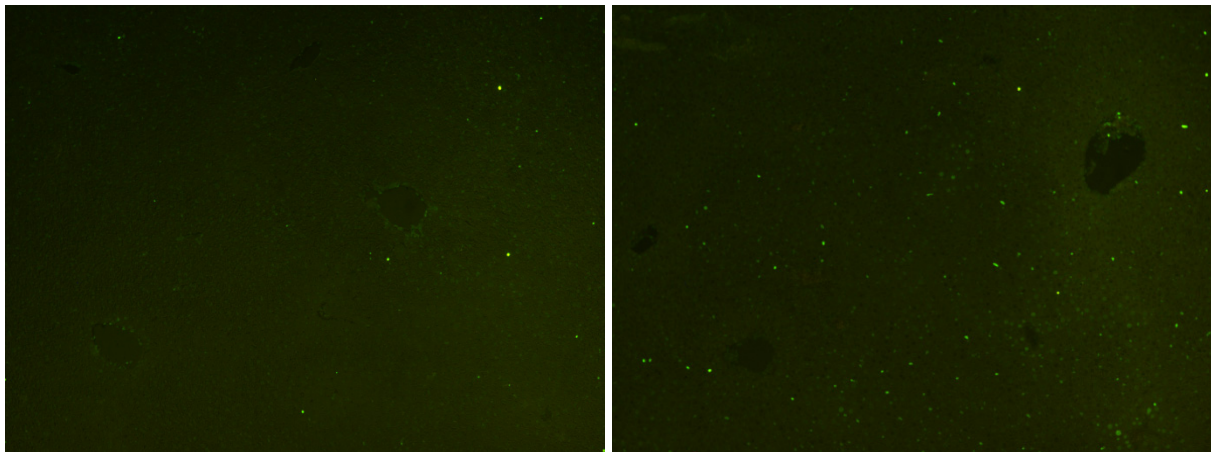


Abb. 52: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Lebergewebeschnitte nach DMSO-Vorbehandlung nach Scheinoperation (links) und nach Ischämie und Reperfusion (rechts) bei 10x-Vergrößerung und einer Exzitationswellenlänge von 450nm, sowie einer Detektionswellenlänge von 515nm. Fluoreszenzmarkierungen entsprechen abgestorbenen Zellen.

Ähnlich wie in der Baicalein-Gruppe (vgl. 4.2.2) konnte auch nach DMSO-Vorbehandlung eine signifikante Steigerung an toten Zellen im Lebergewebe der Sham-operierten Tieren um $1,70\% \pm 0,47\%$ im Vergleich zur unbehandelten Sham-Gruppe nachgewiesen werden, was

einer Zelltodzunahme um das 4,7-fache entspricht ($p < 0,001$) (Abb. 53). Der gemessene Anteil an abgestorbenen Zellen bezogen auf die Gesamtfläche lag hierbei bei $2,09\% \pm 0,46\%$. Die Leberlappen, bei welchen ein Ischämie-Reperfusionsschaden induziert wurde, wiesen nach fluoreszenzmikroskopischer Auswertung mit $9,98\% \pm 1,60\%$ einen um absolut $3,02\% \pm 2,67\%$ niedrigeren Anteil zerfallener Zellen auf als die unbehandelte IRI-Gruppe (Abb. 53). Auch wenn mit einer relativen Zelltodreduktion von 23,2% ein deutlich negativer Regulationstrend zu erkennen war, konnte keine Signifikanz errechnet werden ($p = 0,2596$).

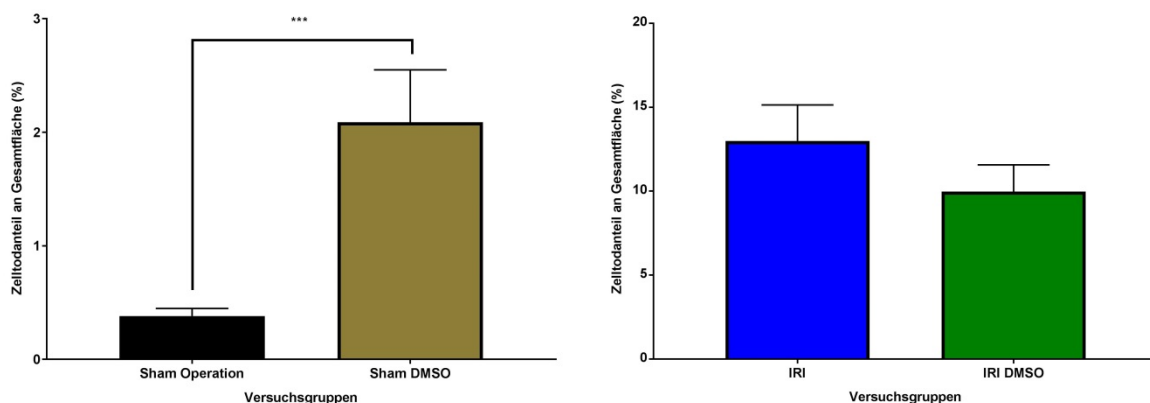


Abb. 53: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Zelltodanalyse im explantierten Lebergewebe mittels TUNEL-Assay in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation (links) ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und mit DMSO-Vorbehandlung (goldener Balken, Sham DMSO), sowie nach Ischämie und Reperfusion (rechts) im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach DMSO-Vorbehandlung (grüner Balken, IRI DMSO). Statistik (t-Test): *** entspricht einem p-Wert von $< 0,001$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Die Skalen der Diagramme unterscheiden sich ca. um den Faktor 7.

4.3.3 Proapoptotische Enzyme

Analog zu den restlichen Therapiegruppen wurden die Unterschiede einer DMSO-Vorbehandlung auf die Aktivität der gemessenen proapoptotischen Proteine nach Sham- und IRI-Operation mit den jeweiligen unbehandelten Versuchsgruppen statistisch verglichen.

4.3.3.1 ERK1/2

Nach DMSO-Vorbehandlung konnte im Vergleich mit der unbehandelten Gruppe kein signifikanter Unterschied der ERK1/2- Aktivität bei den Sham-operierten Tieren festgestellt werden ($p = 0,9546$). Der ERK1/2-Aktivitätsquotient aus dem phosphorylierten ERK1/2-Anteil und der gesamten ERK1/2-Proteinmasse lag ohne Vorbehandlung nach Scheinoperation bei $0,085 \pm 0,02$, während das DMSO-vorbehandelte Lebergewebe eine ERK1/2-Aktivität von $0,086 \pm 0,01$ aufwies (Abb. 54).

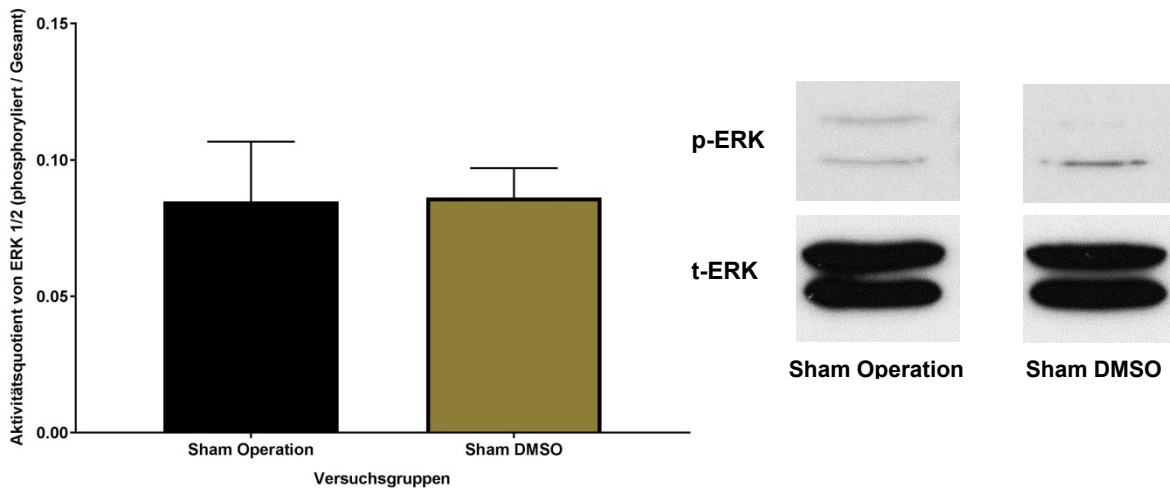


Abb. 54: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 und Gesamt-ERK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach DMSO-Vorbehandlung (goldener Balken, Sham DMSO). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 (oben, p-ERK) und Gesamt-ERK (unten, t-ERK) nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (links, Sham Operation) und nach DMSO-Vorbehandlung (rechts, Sham DMSO), jeweils bei 42 und 44 kDa.

In der Gruppe nach IRI-Induktion bot sich ein vergleichbares Bild. Auch hier war kein relevanter oder gar signifikanter Unterschied der ERK1/2-Aktivität zwischen den DMSO-vorbehandelten Mäusen und jenen ohne Vorbehandlung nachzuweisen ($p = 0,9471$) (Abb. 55). In den postischämischen Leberlappen der DMSO-vorbehandelten Tiere fand sich ein ERK1/2-Aktivitätsquotient von $0,50 \pm 0,19$, der Mittelwert der ERK1/2-Aktivität lag ohne Vorbehandlung bei $0,51 \pm 0,15$ und war somit fast identisch ausgeprägt (-3,2%).

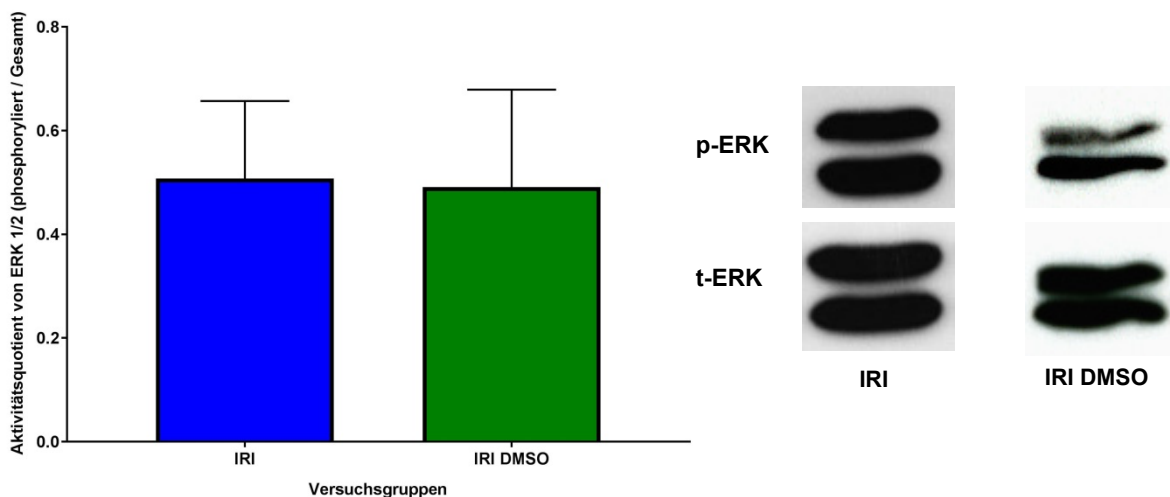


Abb. 55: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 und Gesamt-ERK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach DMSO-Vorbehandlung (grüner Balken, IRI DMSO). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 (oben, p-ERK) und Gesamt-ERK (unten, t-ERK) nach Ischämie

und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (links, IRI) und nach DMSO-Vorbehandlung (rechts, IRI DMSO), jeweils bei 42 und 44 kDa.

4.3.3.2 SAPK/JNK

Auch bei Untersuchung des SAPK/JNK-Aktivitätsquotienten aus phosphorylierter SAPK/JNK und des gesamten SAPK/JNK-Proteinanteils konnte bei den Sham-operierten kein relevanter Unterschied nach DMSO-Gabe gemessen werden. Bei den scheinoperierten, unbehandelten Tieren konnte im Lebergewebe ein Aktivitätsquotient von $0,054 \pm 0,005$ errechnet werden, nach DMSO-Vorbehandlung lag dieser Wert bei $0,050 \pm 0,004$ (Abb. 56). Die relative, insignifikante Aktivitätsabnahme von SAPK/JNK lag somit bei 8,5% ($p = 0,4826$).

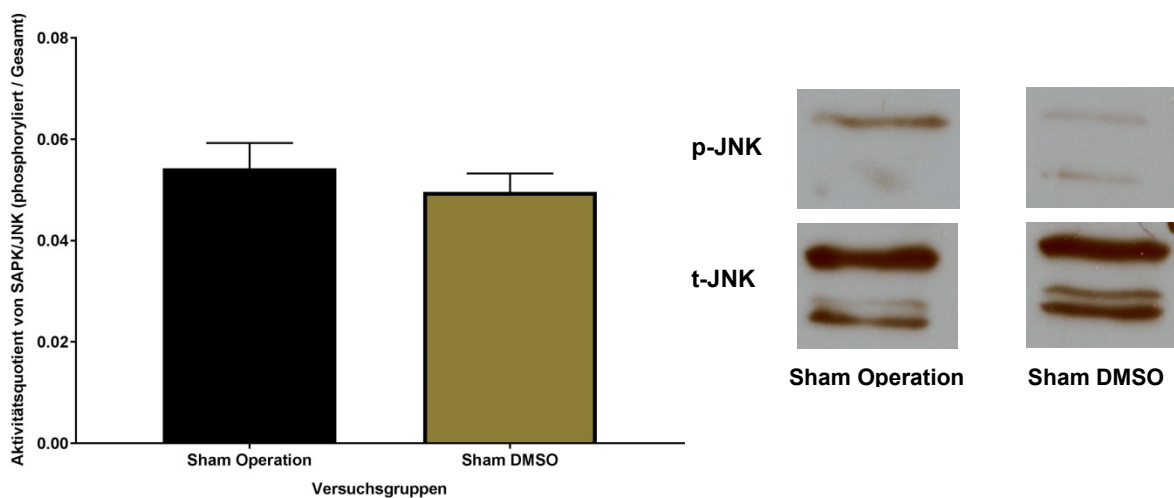


Abb. 56: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK und Gesamt-SAPK/JNK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach DMSO-Vorbehandlung (goldener Balken, Sham DMSO). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK (oben, p-JNK) und Gesamt-SAPK/JNK (unten, t-JNK) nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (links, Sham Operation) und nach DMSO-Vorbehandlung (rechts, Sham DMSO), jeweils bei 46 und 54 kDa.

Ein weitaus deutlicheres Ergebnis wurde durch die Auswertung des SAPK-JNK-Aktivitäts-Niveaus nach hepatischer Ischämie und Reperfusion deutlich. Während der SAPK/JNK-Aktivitätsquotient nach IRI ohne Vorbehandlung bei $0,90 \pm 0,20$ lag, konnte SAPK/JNK nach DMSO-Gabe nur noch mit $0,27 \pm 0,09$ aktiv gemessen werden (Abb. 57). Somit war nach DMSO-Therapie eine signifikante Aktivitätsreduktion von SAPK/JNK um 69,7% festzustellen ($p = 0,0147$).

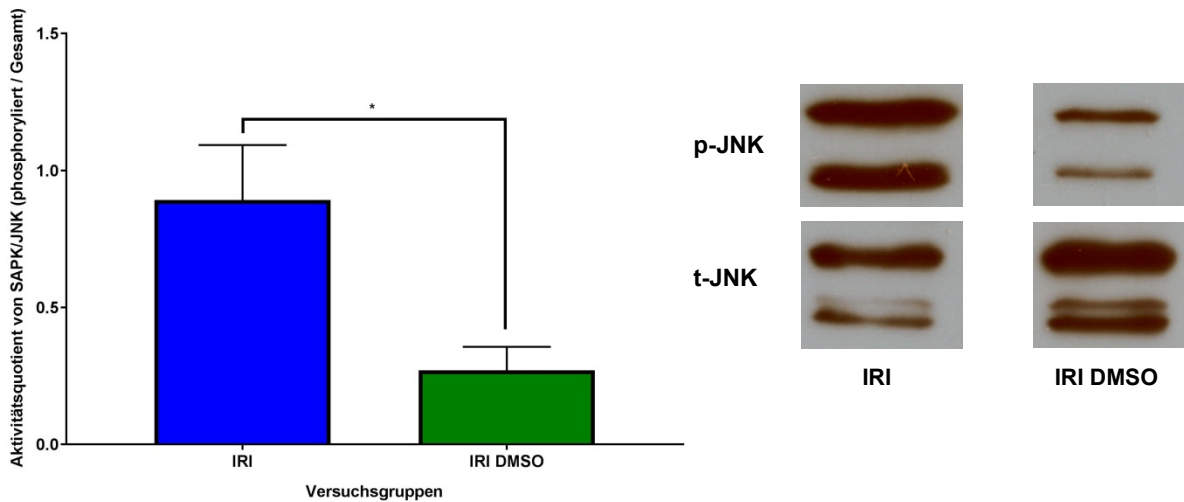


Abb. 57: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK und Gesamt-SAPK/JNK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach DMSO-Vorbehandlung (grüner Balken, IRI DMSO). Statistik (t-Test): * entspricht einem p-Wert von $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK (oben, p-JNK) und Gesamt-SAPK/JNK (unten, t-JNK) nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (links, IRI) und nach DMSO-Vorbehandlung (rechts, IRI DMSO), jeweils bei 46 und 54 kDa.

4.3.3.3 Caspase-3

Nach Auswertung des Caspase-3-Aktivitätsquotienten aus aktivierter Caspase-3 und der jeweiligen Ladekontrolle GAPDH konnte festgestellt werden, dass es bei den scheinoperierten Tieren zu einem leicht positiven Regulationstrend der Caspase-3-Aktivität nach DMSO-Gabe kam. Dieser war mit 15,0% jedoch nicht signifikant ($p = 0,4608$) (Abb. 58). Das Caspase-3-Aktivitätsniveau der unbehandelten Tiere lag bei $0,061 \pm 0,009$, jenes der DMSO-vorbehandelten Versuchstiere mit Sham-Operation bei $0,71 \pm 0,008$.

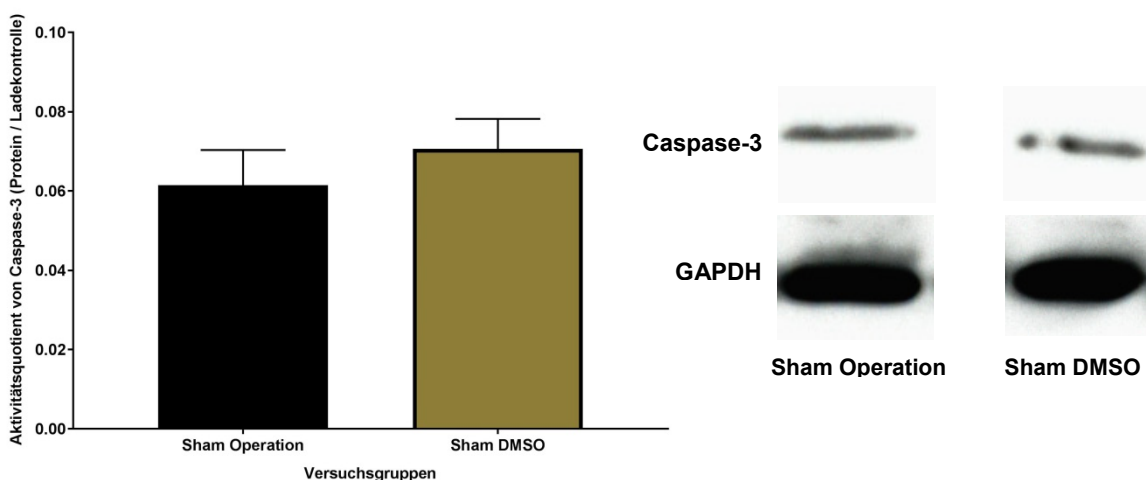


Abb. 58: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter Caspase-3 und deren Ladekontrolle GAPDH im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation

ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach DMSO-Vorbehandlung (goldener Balken, Sham DMSO). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter Caspase-3 (oben, Caspase-3) und deren Ladekontrolle GAPDH (unten, GAPDH) nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (links, Sham Operation) und nach DMSO-Vorbehandlung (rechts, Sham DMSO), jeweils bei 19 kDa (Caspase-3) und 37 kDa (GAPDH).

Ein ähnliches Bild präsentierte sich bei Auswertung der postischämisch geschädigten Leberlappen. In der IRI-Gruppe kam es nach DMSO-Gabe ebenfalls zu einem leichten Mittelwertanstieg des Caspase-3-Aktivitätsquotienten von 26,0% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 59). Jedoch konnte für diese Ergebnis ebenfalls keine Signifikanz errechnet werden ($p = 0,0597$). Die Aktivitätsmittelwerte der Caspase-3 stiegen von $0,75 \pm 0,04$ in den unbehandelten Lebern der IRI Gruppe auf $0,94 \pm 0,08$ im hepatischen Gewebe nach IRI-Induktion und DMSO-Vorbehandlung an.

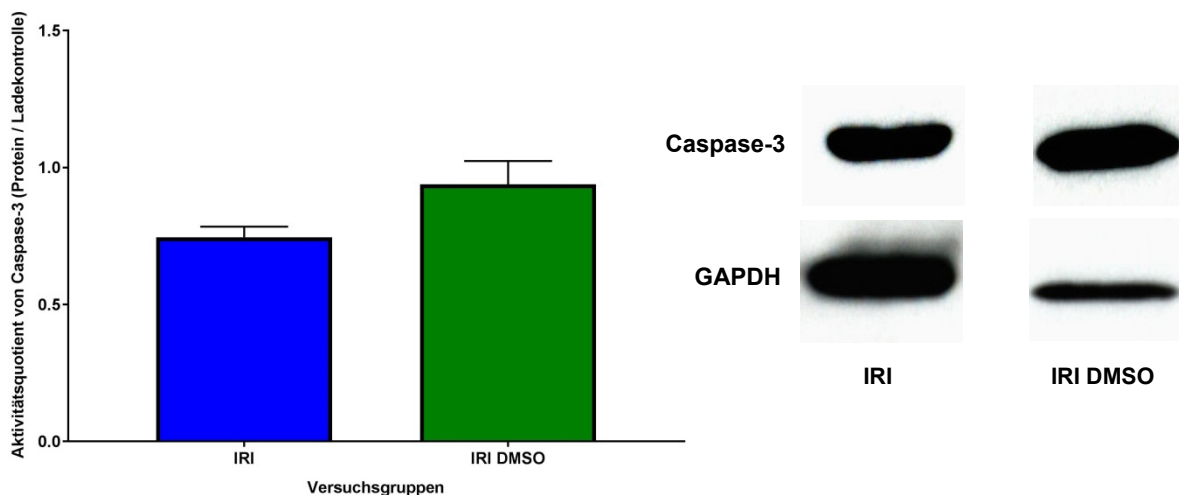


Abb. 59: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter Caspase-3 und deren Ladekontrolle GAPDH im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach DMSO-Vorbehandlung (grüner Balken, IRI DMSO). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter Caspase-3 (oben, Caspase-3) und deren Ladekontrolle GAPDH (unten, GAPDH) nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (links, IRI) und nach DMSO-Vorbehandlung (rechts, IRI DMSO), jeweils bei 19 kDa (Caspase-3) und 37 kDa (GAPDH).

4.3.3.4 PARP

Vergleichbar mit den zuvor genannten Apoptose-Enzymen, konnte auch bei dem Vergleich des PARP-Aktivitätsquotienten aus aktiver, gespaltener PARP und deren Gesamtmasse zwischen den unbehandelten Sham-Lebern und den DMSO-vorbehandelten Sham-Lebern kein nennenswerter Unterschied festgestellt werden. Die PARP-Aktivität lag nach DMSO Vorbehandlung mit $0,080 \pm 0,009$ nur marginal unterhalb des PARP-Aktivitätsquotienten von $0,082 \pm 0,008$ in der unbehandelten Sham-Gruppe (Abb. 60).

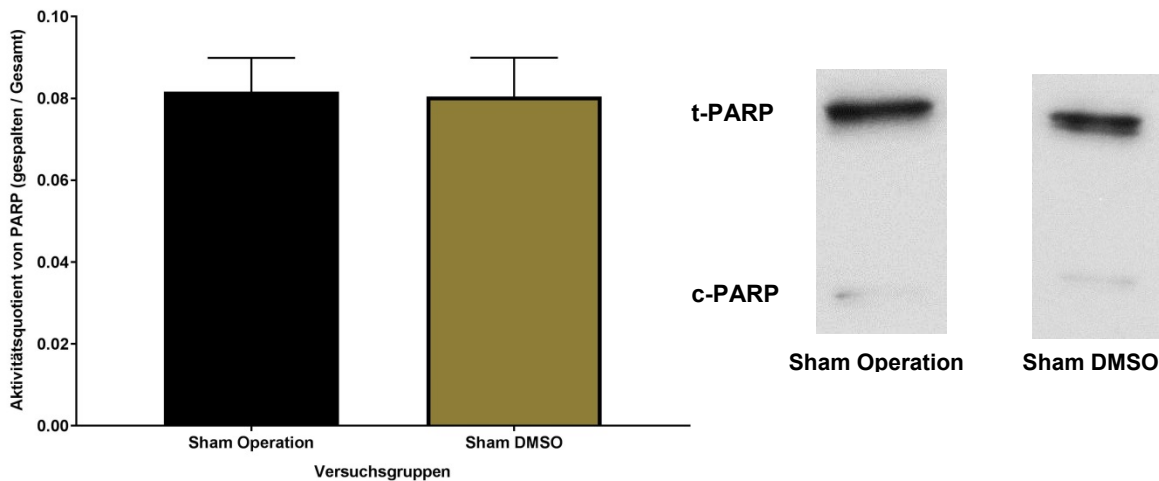


Abb. 60: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, gespalteener PARP und Gesamt-PARP im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach DMSO-Vorbehandlung (goldener Balken, Sham DMSO). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, gespalteener PARP (unten, c-PARP) und Gesamt-PARP (oben, t-PARP) nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (links, Sham Operation) und nach DMSO-Vorbehandlung (rechts, Sham DMSO), jeweils bei 89 kDa (c-PARP) und 116 kDa (t-PARP).

Allerdings konnte auch bei PARP wieder ein signifikanter Aktivitätsunterschied in den Gruppen nach IRI-Induktion zwischen den unbehandelten Mäusen und jenen nach DMSO-Therapie gemessen werden ($p = 0,0369$) (Abb. 61). Während der Aktivitätsquotient in der unbehandelten IRI-Gruppe bei $0,66 \pm 0,18$ lag, sank dieser nach DMSO-Vorbehandlung auf $0,21 \pm 0,06$ ab. Somit konnte die PARP-Aktivität durch DMSO-Vorbehandlung um 68,9% reduziert werden.

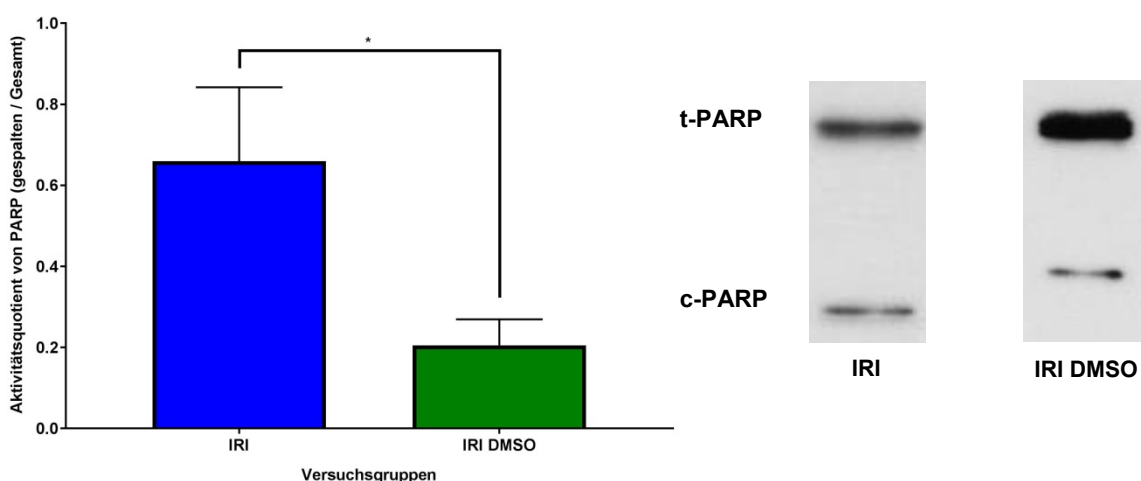


Abb. 61: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, gespalteener PARP und Gesamt-PARP im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach DMSO-Vorbehandlung (grüner Balken, IRI DMSO). Statistik (t-Test): * entspricht einem p-Wert von $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausge-

wählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, gespaltener PARP (unten, c-PARP) und Gesamt-PARP (oben, t-PARP) nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (links, IRI) und nach DMSO-Vorbehandlung (rechts, IRI DMSO), jeweils bei 89 kDa (c-PARP) und 116 kDa (t-PARP).

4.3.4 Alteration der Serum-Leberwertkonzentrationen

Bei der Analyse der Serumparameter war festzustellen, dass die Werte von Kreatinin und Bilirubin durch die DMSO-Vorbehandlung nicht signifikant alteriert waren (Tab. 12). Die ChE zeigte mit $+11,3\% \pm 3,6\%$ einen leicht erhöht messbaren Wert, wenngleich nicht signifikant ($p = 0,17$). Die Parameter der Leberzellschädigung zeigten erneut deutlichere Enzymaktivitätssteigerungen (Abb. 62). Während die GLDH nach DMSO-Gabe um $172,4\% \pm 64,4\%$ tendenziell, aber insignifikant ($p = 0,23$) erhöht messbar war, war der toxische Faktor der GOT mit $+107,8\% \pm 24,3\%$ signifikant erhöht ($p = 0,0047$). Der toxische Faktor der GPT lag bei signifikanten $+122,3\% \pm 32,4\%$ sogar noch höher ($p = 0,0125$).

Laborchemisch untersuchte Serumparameter	Versuchsgruppen						Steigerungsfaktor von DMSO nach IRI- Induktion
	Sham Operation			IRI			
	Ohne Vor- behandlung	DMSO	Toxischer Faktor DMSO	Ohne Vor- behandlung	DMSO	Toxischer Faktor DMSO	
Kreatinin (mg/dl)	0,8 ± 0	0,8 ± 0	0% ± 0%	0,8 ± 0	0,8 ± 0	0% ± 0%	0%
Bilirubin (mg/dl)	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,3	+22,2% ± 17,5%	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	+7,4% ± 8,1%	+5,5% ± 10,1%
GOT (U/l)	152,0 ± 34,3	315,8 ± 65,4	+107,8% ± 24,3% (**)	794,0 ± 213,9	1162,8 ± 310,5	+46,4% ± 15,0%	+268,3% ± 31,8%
GPT (U/l)	121,0 ± 26,5	269,0 ± 73,8	+122,3% ± 32,4% (*)	928,9 ± 316,9	1280,8 ± 427,0	+37,9% ± 18,1%	+376,1% ± 50,9% (*)
GLDH (U/l)	14,5 ± 3,9	39,5 ± 18,3	+172,4% ± 64,4%	131,3 ± 25,7	230,3 ± 68,3	+75,4% ± 17,6%	+483,0% ± 56,6%
ChE (kU/l)	2,9 ± 0,1	3,2 ± 0,2	+11,3% ± 3,6%	2,9 ± 0,1	3,3 ± 0,1	+12,1% ± 1,4% (*)	+1,6% ± 2,0%

Tab. 12: Tabellarische Darstellung der Konzentrationen (für Kreatinin und Bilirubin) und Volumenaktivitäten (für GOT, GPT, GLDH & ChE) laborchemisch untersuchter Parameter nach Scheinoperation (Sham Operation) und nach Ischämie und Reperfusion (IRI) im Serum, jeweils ohne medikamentöse Vorbehandlung und nach DMSO-Vorbehandlung. Die relative Differenz nach DMSO-Vorbehandlung zu keiner Vorbehandlung ist als parameterspezifischer toxischer Faktor angegeben, jeweils pro Versuchsgruppe. Die relative Differenz nach Induktion eines Ischämie-Reperfusionsschaden und nach DMSO-Vorbehandlung zur Scheinoperation nach DMSO-Vorbehandlung ist als parameterspezifischer Steigerungsfaktor von DMSO angegeben. Statistik (Šidák-Test): ** entspricht einem p-Wert $< 0,01$; * entspricht einem p-Wert $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf die durch die parameterspezifischen toxischen Faktoren bzw. Steigerungsfaktoren dargestellten Unterschiede. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Der alleinige Effekt der DMSO-Gabe auf die Serumparameter nach Induktion eines hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens wurde im Folgenden durch den Vergleich der Serumparameter und Bildung der jeweiligen DMSO-spezifischen toxischen Faktoren in der IRI-Gruppe untersucht (Tab. 12; Abb. 62). Eine relevante oder gar signifikante Differenz in der Ausprägung der Kreatinin- oder Bilirubin-Konzentrationen war hierbei nicht festzustellen. Die Parameter der Leberzellschädigung GOT, GPT und GLDH zeigten einen positiven Regulationstrend mit toxischen Faktoren von $+46,4\% \pm 15,0\%$ ($p = 0,37$) für die GOT, $+37,9\% \pm 18,1\%$ ($p = 0,52$) für die GPT und $+75,4\% \pm 17,6\%$ ($p = 0,19$) für die GLDH. Eine statistische

Signifikanz war jedoch für keinen der genannten Blutwerte zu errechnen. Anders verhielt es sich bei der ChE. Der Lebersyntheseparameter konnte erneut gesteigert gemessen werden, dieses Mal statistisch signifikant um $12,1\% \pm 1,4\%$ ($p = 0,01$).

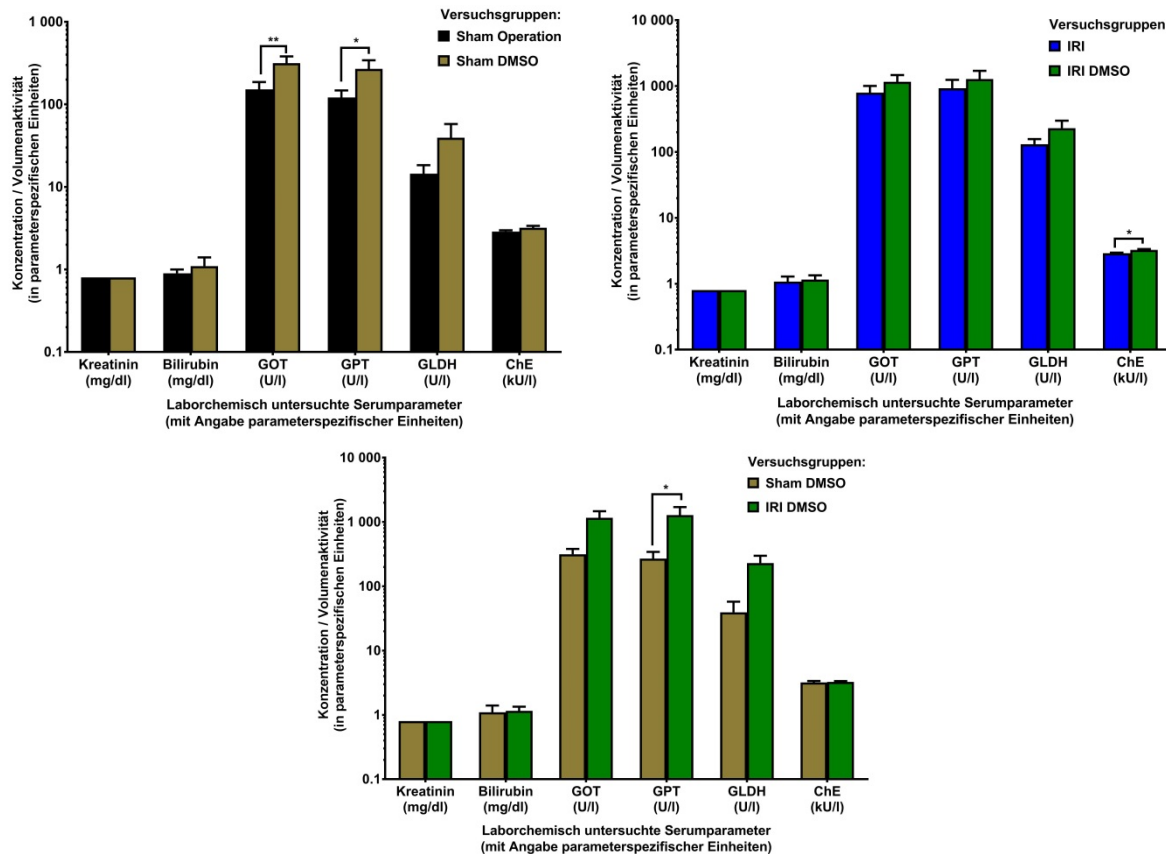


Abb. 62: Graphische, logarithmische Darstellungen der Konzentrationen (für Kreatinin und Bilirubin) und Volumenaktivitäten (für GOT, GPT, GLDH & ChE) laborchemisch untersuchter Parameter nach Scheinoperation (oben links) ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und mit DMSO-Vorbehandlung (goldener Balken, Sham DMSO), sowie nach Ischämie und Reperfusion (oben rechts) ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach DMSO-Vorbehandlung (grüner Balken, IRI Baicalein) im Serum, sowie (unten) nach Scheinoperation (goldener Balken, Sham DMSO) und nach Ischämie und Reperfusion (grüner Balken, IRI DMSO), jeweils nach DMSO-Vorbehandlung. Die parameterspezifischen Einheiten sind in der X-Achsen-Beschriftung angegeben. Statistik (Šidák-Test): ** entspricht einem p-Wert von $< 0,01$; * entspricht einem p-Wert $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Auch für die DMSO-Gruppe erfolgte die Gegenüberstellung der zuvor ermittelten Blutwerte nach Scheinoperation und nach Ischämie und Reperfusion, um den DMSO-spezifischen Steigerungsfaktor zu errechnen (Tab. 12; Abb. 62). Hierbei konnten keine relevanten Alterationen der Konzentrationen von Kreatinin und Bilirubin oder Volumenaktivitäten der ChE zwischen den beiden beschriebenen Gruppen beobachtet werden. Die DMSO-spezifischen Steigerungsfaktoren nach IRI-Induktion für die Leberzellschädigungsparameter GOT, GPT, GLDH zeigten hingegen relevante Unterschiede. Hierbei waren die Steigerungsfaktoren der GOT mit $+268,3\% \pm 31,8\%$ ($p = 0,1190$) und der GLDH mit $+483,0\% \pm 56,6\%$ ($p = 0,1119$) zwar rele-

vant different, statistisch signifikant war dies jedoch nicht. Mit einem p-Wert von 0,0322 signifikant präsentierte sich die Differenz der Volumenaktivitäten der GPT nach IRI im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe. Der Steigerungsfaktor betrug hierbei $+376,1\% \pm 50,9\%$. Um in der weiteren Folge darzustellen, inwiefern sich die DMSO-Behandlung auf die messbaren Effekte im Serum nach Induktion eines IRI auswirkt, erfolgte erneut der Vergleich der soeben errechneten DMSO-spezifischen Steigerungsfaktoren mit jenen der unbehandelten Versuchsgruppen (Abb. 63). Wie zu erwarten war, zeigten sich keine signifikanten Differenzen zwischen den Steigerungsfaktoren in der Analyse von Kreatinin, Bilirubin oder ChE. Allerdings führte die DMSO-Vorbehandlung zu relevant und signifikant gesenkten Steigerungsfaktoren der GOT, GPT und GLDH. So nahm die Enzymwerterhöhung der GOT um $36,5\% \pm 4,5\%$ ($p = 0,0077$) ab, während die Volumenaktivitätssteigerung der GPT sogar um $43,7\% \pm 4,8\%$ ($p < 0,001$) gesenkt gemessen wurde. Dieser relative Steigerungsfaktor betrug für die GLDH $-40,0\% \pm 3,1\%$ ($p < 0,001$). Signifikante Unterschiede zwischen den relativen Steigerungsfaktoren der einzelnen Serumparametern waren hierbei nicht festzustellen (Abb. 63).

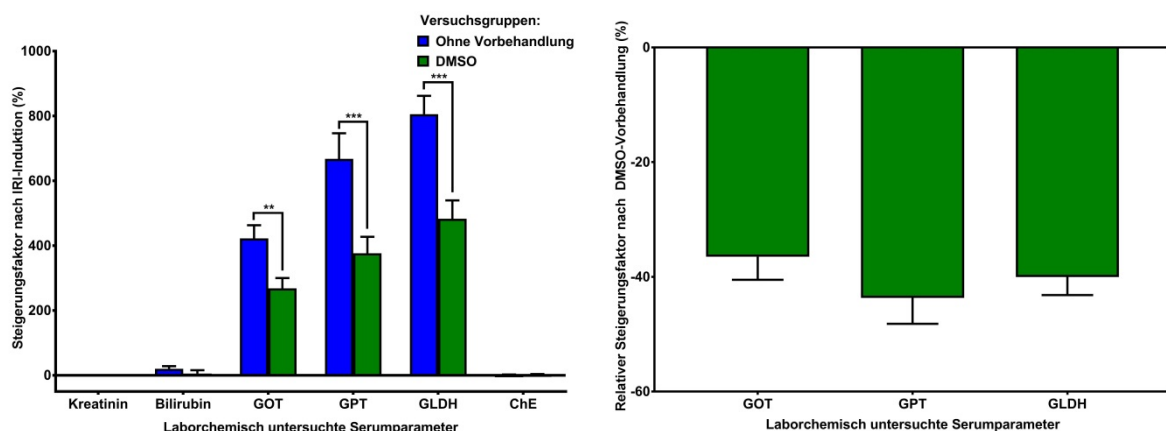


Abb. 63: Links: Graphische Darstellung der parameterspezifischen Steigerungsfaktoren der jeweiligen laborchemisch untersuchten Serumparameter nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zur Scheinoperation, jeweils ohne Vorbehandlung (blauer Balken, ohne Vorbehandlung) und mit DMSO-Vorbehandlung (grüner Balken, DMSO). Rechts: Graphische Darstellung der parameterspezifischen relativen Steigerungsfaktoren nach DMSO-Vorbehandlung der jeweiligen laborchemisch untersuchten Serumparameter als relativer Unterschied der jeweiligen Steigerungsfaktoren nach DMSO-Vorbehandlung im Vergleich zu keiner Vorbehandlung. Statistik (t-Test; Šidák-Test): *** entspricht einem p-Wert von $< 0,001$; ** entspricht einem p-Wert von $< 0,01$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

4.3.5 Substratverbrauch von Gpx4

Aus den spektralphotometrischen Auswertungen konnte erneut der Aktivitätsquotient der Glutathionoxidierung gebildet werden und somit eine Aussage über die Auswirkungen einer DMSO-Therapie auf den Glutathionmetabolismus getroffen werden (Tab. 13).

Versuchsgruppen	Intrazellulärer Gehalt ($\mu\text{mol} / \text{g}$) von		Aktivitätsquotient der Glutathionoxidierung (GSSG / GSH)
	<u>GSH</u>	<u>GSSG</u>	
Sham Operation	$6,89 \pm 1,44$	$32,45 \pm 12,65$	$5,19 \pm 1,77$
Sham DMSO	$4,89 \pm 0,54$	$35,41 \pm 9,98$	$7,24 \pm 1,85$
IRI	$5,98 \pm 0,65$	$27,23 \pm 2,00$	$4,99 \pm 0,68$
IRI DMSO	$6,96 \pm 0,71$	$41,86 \pm 5,52$	$6,29 \pm 0,89$

Tab. 13: Tabellarische Darstellung des mittels Spektralphotometrie intrazellulär nachgewiesenen Gehalts von reduziertem GSH und oxidiertem GSSG nach Scheinoperation (Sham (Operation)) und nach Ischämie und Reperfusion (IRI) im Lebergewebe, jeweils ohne medikamentöse Vorbehandlung und nach DMSO-Vorbehandlung, in $\mu\text{mol/g}$. Das Verhältnis von GSSG zu GSH ist als versuchsgruppenspezifischer Aktivitätsquotient der Glutathionoxidierung angegeben.

Um darzustellen, inwiefern eine DMSO-Therapie auf den Glutathion-Stoffwechsel ohne oxidativen Stress wirkt, wurden die Aktivitätsquotienten der Glutathionoxidierung in den Sham-Gruppen ohne und nach DMSO-Vorbehandlung verglichen (Abb. 64). Ein positiver Regulationstrend nach DMSO-Gabe und Scheinoperation um 39,4% konnte im Vergleich zur unbehandelten, scheinoperierten Gruppe beobachtet werden. So lag der Aktivitätsquotient nach DMSO-Gabe bei $7,24 \pm 1,85$, während in der unbehandelten Gruppe ein Wert von $5,19 \pm 1,77$ zu messen war. Statistische signifikant war dies jedoch nicht. ($p = 0,4548$).

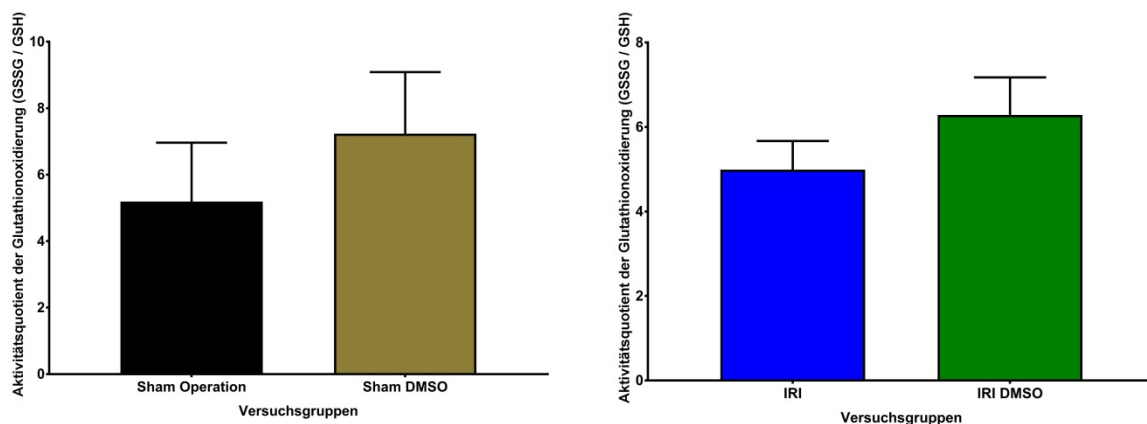


Abb. 64: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten der Glutathionoxidierung aus oxidiertem Glutathion-Disulfid (GSSG) und reduziertem Glutathion (GSH) im explantierten Lebergewebe nach spektralphotometrischer Auswertung in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation (links) ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und mit DMSO-Vorbehandlung (goldener Balken, Sham DMSO), sowie nach Ischämie und Reperfusion (rechts) im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach DMSO-Vorbehandlung (grüner Balken, IRI DMSO). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Im Lebergewebe nach IRI konnte ein ähnlicher Effekt der DMSO-Therapie beobachtet werden (Abb. 64). Hier zeigte sich eine Steigerung des oxidativen Stoffwechsels von Glutathion von $4,99 \pm 0,68$ im medikamentös unbehandelten Gewebe auf $6,29 \pm 0,89$ nach DMSO-Gabe. Dies entsprach einer relativen Steigerung um 26,1%. Mit einem insignifikanten p-Wert von 0,2643 war dieses Ergebnis als positiver Regulationstrend zu werten.

4.4 Effekte der Tacrolimus-Vorbehandlung

4.4.1 Kreislaufparameter

Um Auswirkungen der Tacrolimus-Therapie auf den Kreislauf des Tieres sichtbar zu machen, wurden die Sham-operierten Tiere mit und ohne Vorbehandlung bezüglich der Vitalparameter verglichen, um im Anschluss Selbiges in der Gruppe mit IRI-Induktion zu wiederholen. Im Verlauf des Sham-Experiments sank der Mitteldruck von 95,7 mmHg bei Kanülierung bis auf 84,3 mmHg zum Ende der Operation ab (Abb. 65). Zu keinem Zeitpunkt konnte hierbei ein signifikanter Unterschied des Blutdruckkurvenverlaufs zu der unbehandelten Gruppe festgestellt werden. Bei der Auswertung der Vitalparameterdaten konnte ein ähnliches Ergebnis für die Versuchsgruppen mit IRI-Induktion festgehalten werden. Auch hier war während des gesamten Experiments kein signifikanter Unterschied zwischen den Blutdruckkurven nach Tacrolimusgabe und ohne Vorbehandlung festzustellen. Wie in 4.1.1 beschrieben, kam es auch nach Tacrolimus-Vorbehandlung zu einem konsekutiven, leichten Mitteldruckverlust von initial 94,3 mmHg auf 62,3 mmHg. Außerdem konnte ebenfalls ein signifikanter ($p = 0,0073$) Postreperfusionenabfall des Mitteldrucks um max. 23 mmHg festgestellt werden, welcher sich analog zu den anderen Versuchsgruppen selbstständig regredient zeigte.

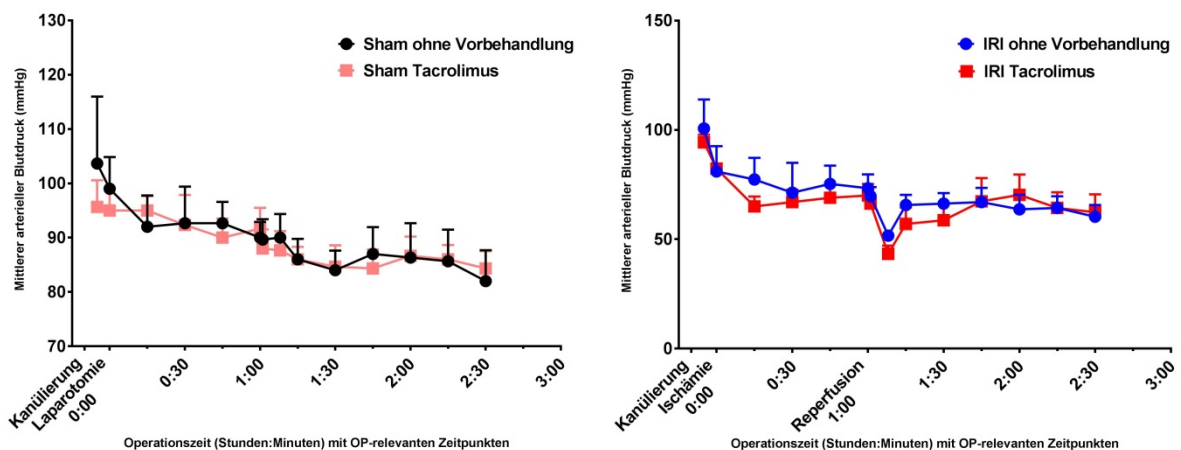


Abb. 65: Graphische Darstellung der Blutdruckkurven der Gruppen mit Scheinoperation (links) ohne Vorbehandlung (schwarze Kurve, Sham ohne Vorbehandlung) und mit Tacrolimus-Vorbehandlung (rosé Kurve, Sham Tacrolimus), sowie mit IRI-Induktion (rechts) ohne Vorbehandlung (blaue Kurve, IRI ohne Vorbehandlung) und mit Tacrolimus-Vorbehandlung (rote Kurve, IRI Tacrolimus) im Verlauf des Experiments. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Der Verlauf der erhobenen Pulskurven dieser Versuchsgruppen zeigte ein vergleichbares Ergebnis. Sowohl bei den scheinooperierten Tieren, als auch bei der IRI-Gruppe konnte nach Tacrolimus-Vorbehandlung kein signifikanter Unterschied zu den jeweiligen Kurven der unbehandelten Gruppen errechnet werden. Im Gesamten lagen die Blutdruckmittelwerte in

der Sham- und IRI-Gruppe zu jedem Zeitpunkt unter den Vergleichswerten der unbehandelten Tiere, dies jedoch nur insignifikant.

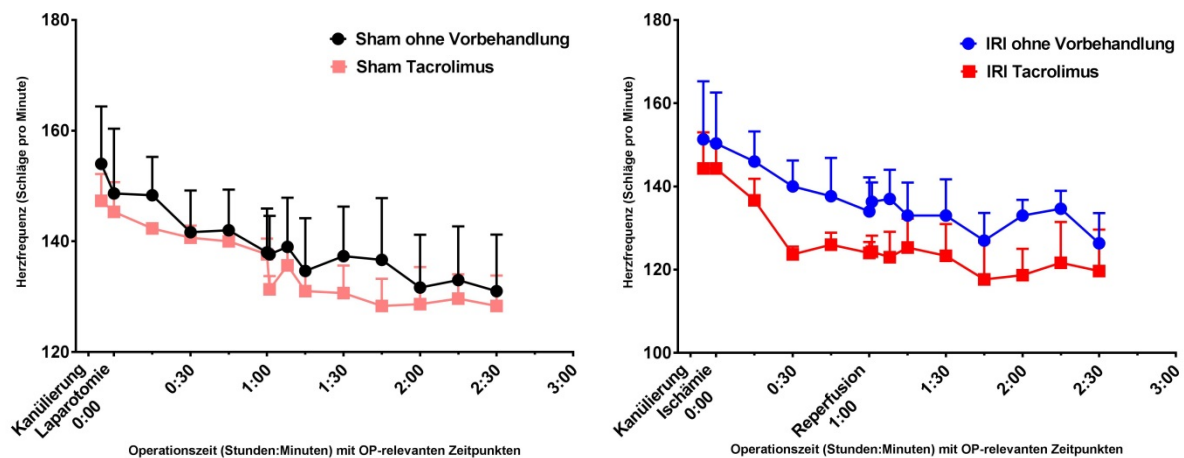


Abb. 66: Graphische Darstellung der Pulskurven der Versuchsgruppen mit Scheinoperation (links) ohne Vorbehandlung (schwarze Kurve, Sham ohne Vorbehandlung) und mit Tacrolimus-Vorbehandlung (rosé Kurve, Sham Tacrolimus), sowie mit IRI-Induktion (rechts) ohne Vorbehandlung (blaue Kurve, IRI ohne Vorbehandlung) und mit Tacrolimus-Vorbehandlung (rote Kurve, IRI Tacrolimus) im Verlauf des Experiments. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

4.4.2 Zelltod

Analog zur den anderen Versuchsgruppen, erfolgte zunächst die statistische Auswertung des Effektes einer Tacrolimus-Vorbehandlung auf die native Leber ohne oxidativen Stress durch Vergleich der Tacrolimus- (Abb. 67 links) und der unbehandelten Gruppe nach Sham-Operation. Weiterhin wurden die jeweiligen Gruppen mit hepatischem IRI bezüglich relevanter Unterschiede getestet (Abb. 67 rechts).

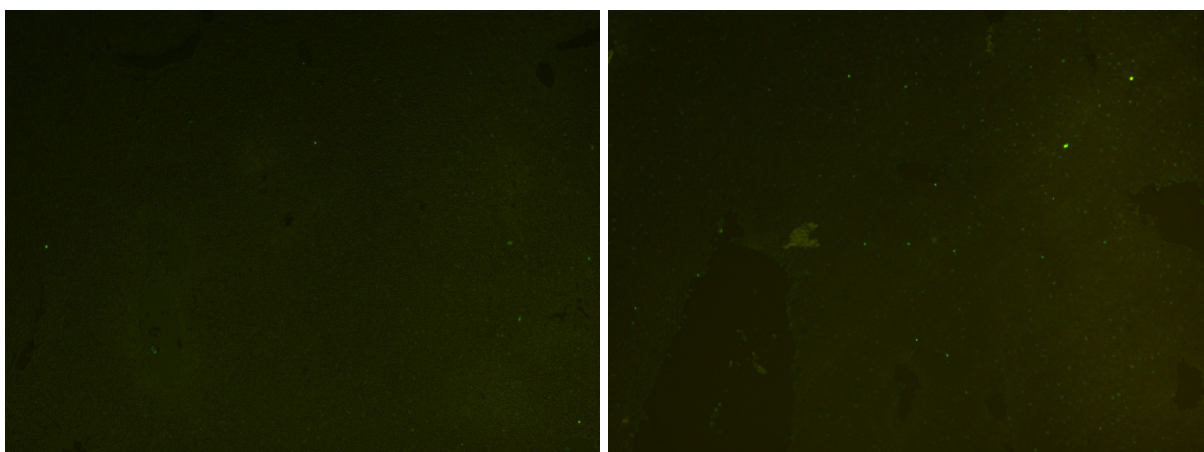


Abb. 67: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Lebergewebeschnitte nach Tacrolimus-Vorbehandlung nach Scheinoperation (links) und nach Ischämie und Reperfusion (rechts) bei 10x-Vergrößerung und einer Exzitationswellenlänge von 450nm, sowie einer Detektionswellenlänge von 515nm. Fluoreszenzmarkierungen entsprechen abgestorbenen Zellen.

So kam es auch nach Tacrolimus-Vorbehandlung zu einer signifikanten Steigerung der apoptotischen Zellen nach Sham-Operation im Vergleich zur unbehandelten Gruppe ($p < 0,001$) (Abb. 68). Es konnte hierbei eine absolute Steigerung des intrahepatischen Zelltods um $0,69\% \pm 0,19\%$ auf $1,07\% \pm 0,18\%$ der Leberfläche gemessen werden, also eine relative Erhöhung um das 1,8-fache. Bei Untersuchung des postischämischen Lebergewebes nach Tacrolimusgabe konnte festgehalten werden, dass auch hier eine absolute Reduktion des Zelltods um $8,03\% \pm 2,49\%$ auf einen Flächenfraktion von $4,97\% \pm 0,92\%$ im Vergleich zur unbehandelten IRI-Gruppe beobachtet werden konnte (Abb. 68). Dieses Ergebnis war hochsignifikant ($p = 0,0015$) und entsprach einer relativen Zelltodreduktion um 61,8%.

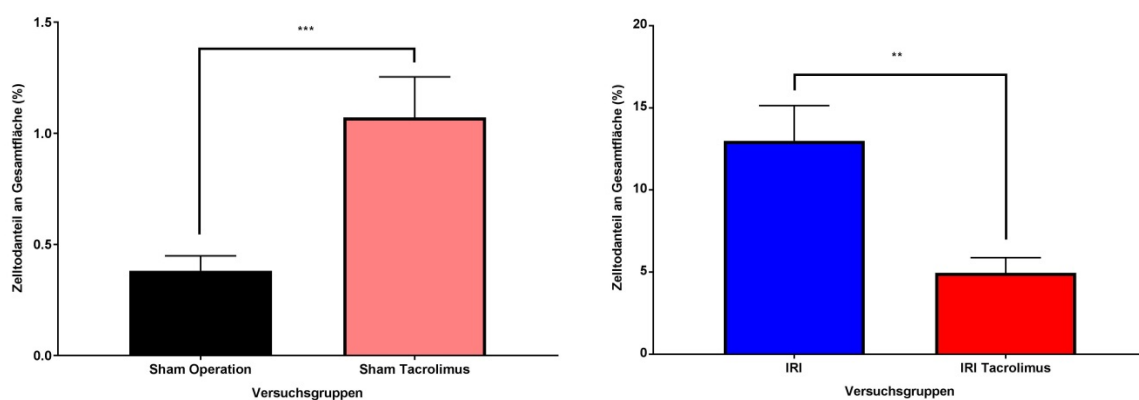


Abb. 68: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Zelltodanalyse im explantierten Lebergewebe mittels TUNEL-Assay in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation (links) ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und mit Tacrolimus-Vorbehandlung (rosé Balken, Sham DMSO), sowie nach Ischämie und Reperfusion (rechts) im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (roter Balken, IRI DMSO). Statistik (t-Test): *** entspricht einem p-Wert von $< 0,001$; ** entspricht einem p-Wert von $< 0,01$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Die Skalen der Diagramme unterscheiden sich ca. um den Faktor 15.

4.4.3 Proapoptotische Enzyme

Der Effekt der Tacrolimus-Vorbehandlung auf die im Lebergewebe aktiven proapoptotischen Proteine erfolgte erneut durch Vergleich der Enzymaktivitäten ohne Vorbehandlung und nach Tacrolimus-Vorbehandlung, jeweils für die Sham- und die IRI-Gruppe.

4.4.3.1 ERK1/2

Es konnte auch nach isolierter Tacrolimus-Vorbehandlung kein relevanter Unterschied des ERK1/2-Aktivitätsquotienten im Vergleich zur unbehandelten Gruppe nach Scheinoperation festgestellt werden ($p = 0,8486$). Während der Aktivitätsquotient von ERK1/2 nach Tacrolimus-Vorbehandlung bei $0,080 \pm 0,009$ gemessen wurde, lag dieser in der unbehandelten Gruppe nur insignifikant höher bei $0,085 \pm 0,022$ (Abb. 69).

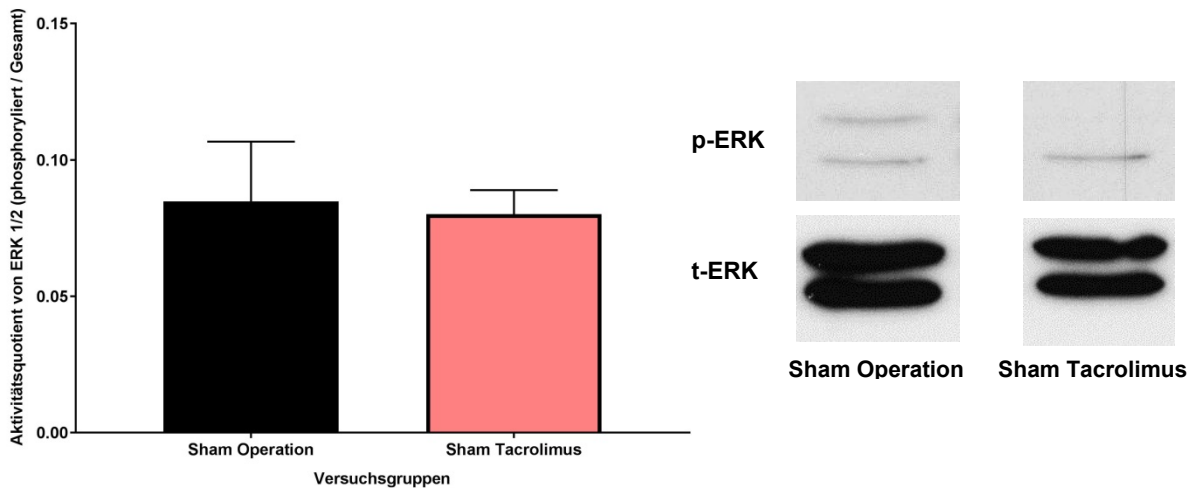


Abb. 69: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 und Gesamt-ERK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (rosé Balken, Sham Tacrolimus). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 (oben, p-ERK) und Gesamt-ERK (unten, t-ERK) nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (links, Sham Operation) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (rechts, Sham Tacrolimus), jeweils bei 42 und 44 kDa.

Nach Induktion eines hepatischen IRI war ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten und den mit Tacrolimus vorbehandelten Mäusen in der ERK1/2-Aktivitätsmessung festzustellen ($p = 0,6717$). Allerdings fiel das Ergebnis etwas deutlicher aus als in den unbehandelten Gruppen. Ein negativer Regulationstrend um -19,1% durch die Tacrolimus-Behandlung konnte im Vergleich zur Gruppe ohne Vorbehandlung konstatiert werden. Die Mittelwerte der ERK1/2-Aktivitätsquotienten nahmen durch die Tacrolimusgabe von $0,51 \pm 0,15$ im unbehandelten Lebergewebe auf $0,41 \pm 0,17$ ab (Abb. 70).

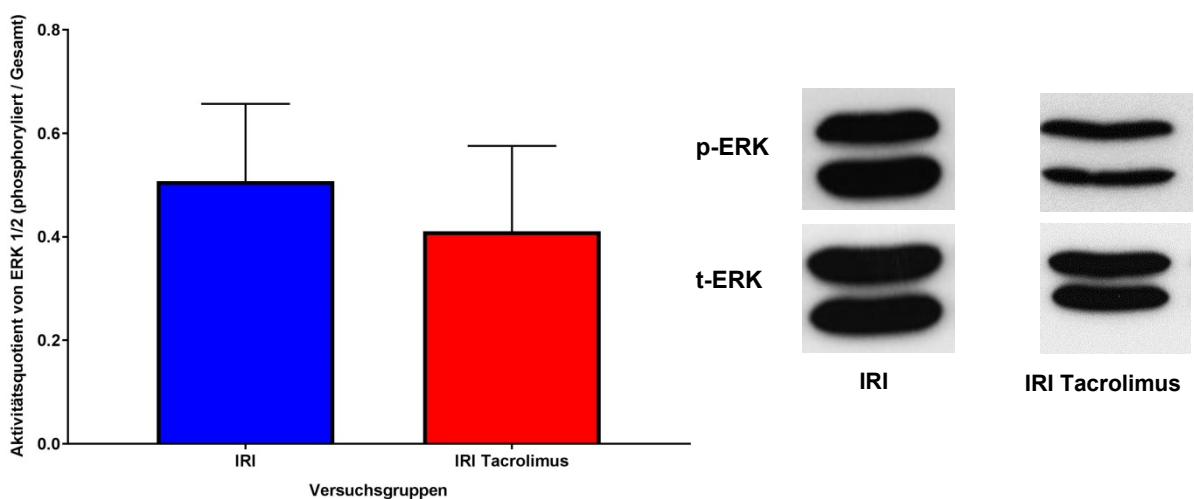


Abb. 70: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 und Gesamt-ERK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (roter

Balken, IRI Tacrolimus). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 (oben, p-ERK) und Gesamt-ERK (unten, t-ERK) nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (links, IRI) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (rechts, IRI Tacrolimus), jeweils bei 42 und 44 kDa.

4.4.3.2 SAPK/JNK

Der Aktivitätsquotient von SAPK/JNK konnte im Vergleich zur ERK1/2-Untersuchung bereits in der Sham-Gruppe durch Tacrolimusgabe signifikant verringert werden ($p = 0,0335$). Während die unbehandelten, scheinoperierten Mäuse eine SAPK/JNK-Aktivität von $0,054 \pm 0,005$ aufwiesen, lag der Mittelwert nach Tacrolimus-Behandlung bei lediglich $0,040 \pm 0,002$. So führte die Tacrolimus-Vorbehandlung zu einer Aktivitätsreduktion um 25,8 % (Abb. 71).

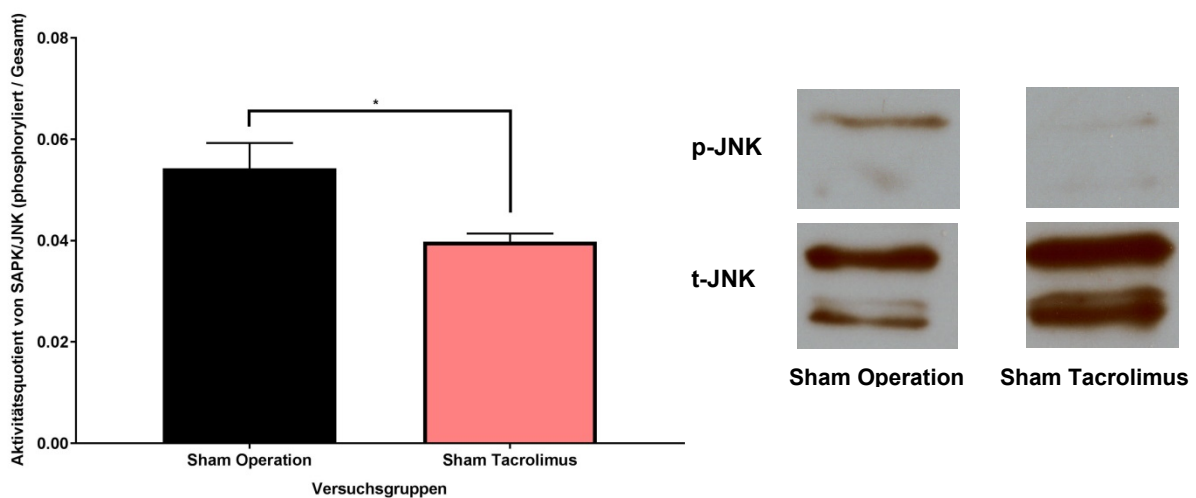


Abb. 71: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK und Gesamt-SAPK/JNK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (rosé Balken, Sham Tacrolimus). Statistik (t-Test): * entspricht einem p-Wert von $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK (oben, p-JNK) und Gesamt-SAPK/JNK (unten, t-JNK) nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (links, Sham Operation) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (rechts, Sham Tacrolimus), jeweils bei 46 und 54 kDa.

Ein noch deutlicheres Bild zeigte sich beim Vergleich der Vorbehandlungen in der IRI-Gruppe. Der SAPK/JNK-Aktivitätsquotient lag in der unbehandelten-Gruppe hierbei bei $0,89 \pm 0,20$. In der Gruppe nach Tacrolimus-Vorbehandlung konnte dieser Wert auf $0,14 \pm 0,10$ gesenkt gemessen werden. Damit wurde eine signifikante Abnahme der SAPK/JNK-Aktivität um 84,6% durch die Vorbehandlung mit Tacrolimus registriert ($p = 0,0059$) (Abb. 72).

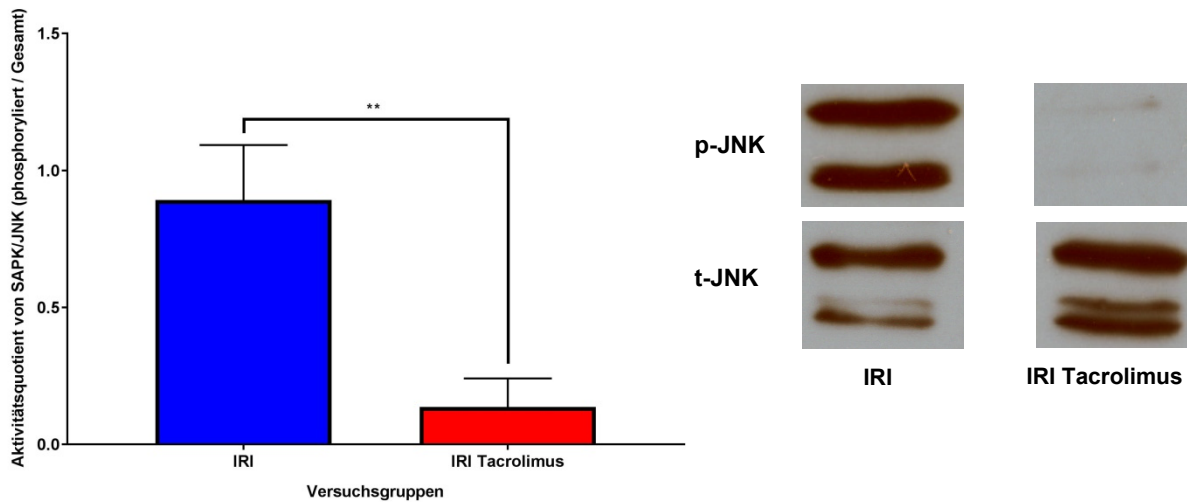


Abb. 72: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK und Gesamt-SAPK/JNK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (roter Balken, IRI Tacrolimus). Statistik (t-Test): ** entspricht einem p-Wert von $< 0,01$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK (oben, p-JNK) und Gesamt-SAPK/JNK (unten, t-JNK) nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (links, IRI) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (rechts, IRI Tacrolimus), jeweils bei 46 und 54 kDa.

4.4.3.3 Caspase-3

Der Aktivitätsquotient von Caspase-3 aus aktivierter Caspase-3 und GAPDH wurde nach Sham-Operation von der Tacrolimus-Behandlung nur insignifikant beeinflusst ($p = 0,2234$). Die unbehandelte Sham-Gruppe wies einen Caspase-3-Aktivitätsquotienten von $0,061 \pm 0,009$ auf. Im Vergleich hierzu war die Aktivität der Caspase-3 mit $0,048 \pm 0,004$ nach Tacrolimusgabe leicht reduziert. Der negative Regulationstrend der Caspase-3-Aktivität in der Tacrolimus-Gruppe nach Sham-Operation lag somit bei -21,3% (Abb. 73).

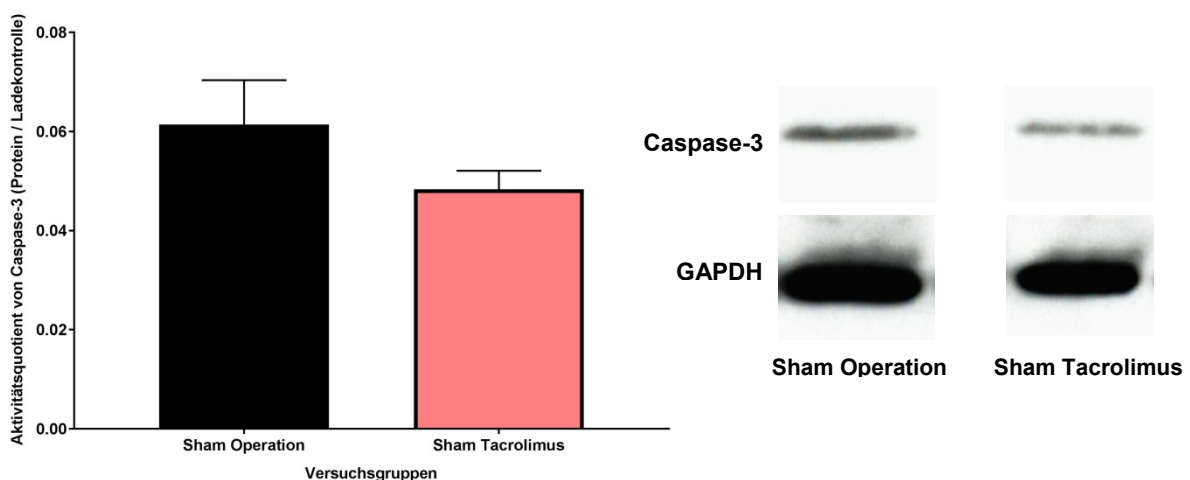


Abb. 73: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter Caspase-3 und deren Ladekontrolle GAPDH im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation

ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (rosé Balken, Sham Tacrolimus). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter Caspase-3 (oben, Caspase-3) und deren Ladekontrolle (unten, GAPDH) nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (links, Sham Operation) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (rechts, Sham Tacrolimus), jeweils bei 19 kDa (Caspase-3) und 37 kDa (GAPDH).

Eine hohe Signifikanz konnte jedoch beim Vergleich der Tacrolimusgabe mit der unbehandelten Gruppe nach IRI-Induktion errechnet werden ($p = <0,001$). Caspase-3 lag zu einem Anteil von $0,75 \pm 0,04$ in den unbehandelten, postischämischen Leberlappen aktiviert vor. Im Vergleich hierzu betrug der Aktivitätsquotient der Caspase-3 nach Tacrolimus-Vorbehandlung lediglich $0,25 \pm 0,02$. Somit führte die Tacrolimus-Vorbehandlung zu einer Aktivitätsabnahme von Caspase-3 um 66,9% nach Induktion eines hepatischen IRI (Abb. 74).

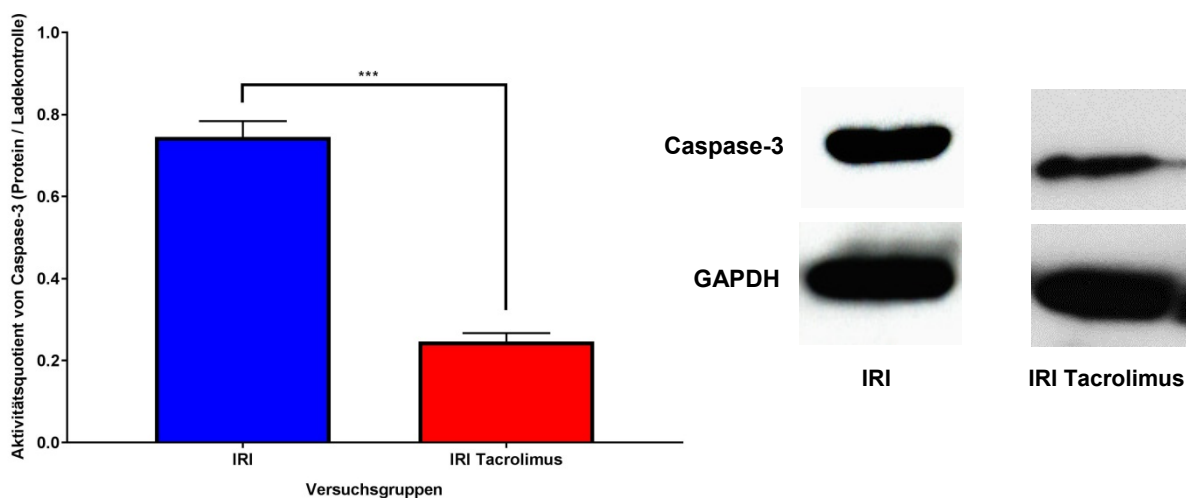


Abb. 74: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter Caspase-3 und deren Ladekontrolle GAPDH im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (roter Balken, IRI Tacrolimus). Statistik (t-Test): *** entspricht einem p-Wert von $< 0,001$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter Caspase-3 (oben, Caspase-3) und deren Ladekontrolle GAPDH (unten, GAPDH) nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (links, IRI) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (rechts, IRI Tacrolimus), jeweils bei 19 kDa (Caspase-3) und 37 kDa (GAPDH).

4.4.3.4 PARP

Die Vorbehandlung mit Tacrolimus führte zu keinem signifikanten Unterschied der PARP-Aktivierung nach Sham-Operation. Der Aktivitätsquotient aus aktivierter, gespaltener PARP und Gesamt-PARP lag in der Gruppe der unbehandelten Tiere bei $0,082 \pm 0,008$. Nach Tacrolimus-Vorbehandlung und Sham-Operation lag dieser insignifikant verringert bei $0,079 \pm 0,012$ ($p = 0,8433$) (Abb. 75).

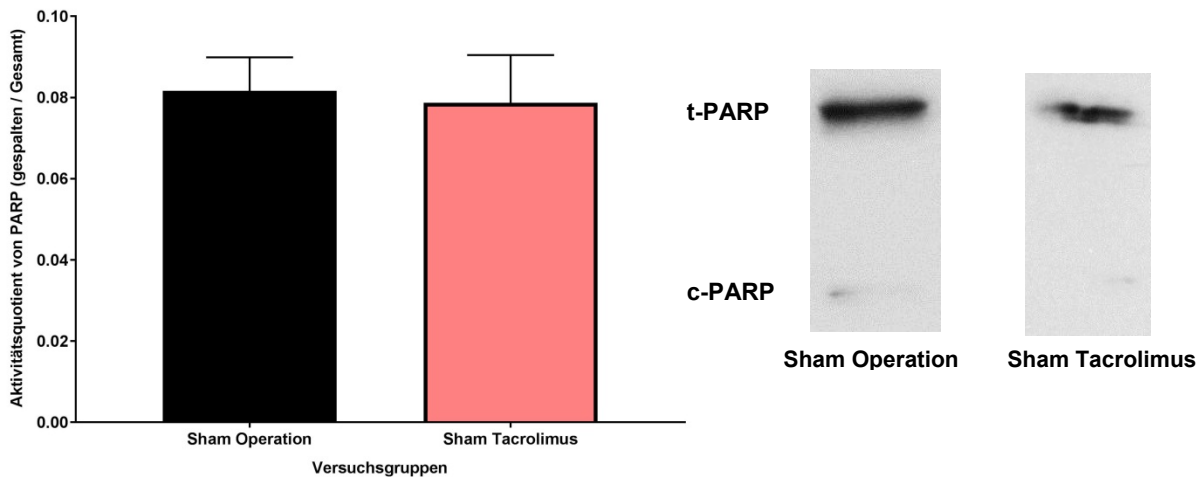


Abb. 75: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, gespalteener PARP und Gesamt-PARP im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (rosé Balken, Sham Tacrolimus). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, gespalteener PARP (unten, c-PARP) und Gesamt-PARP (oben, t-PARP) nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (links, Sham Operation) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (rechts, Sham Tacrolimus), jeweils bei 89 kDa (c-PARP) und 116 kDa (t-PARP).

Ein deutlicherer Unterschied konnte bei Analyse der postischämisch geschädigten Leberlap-
pen registriert werden (Abb. 76). Während der Aktivitätsquotient von PARP nach IRI-Induk-
tion im unbehandelten Lebergewebe bei $0,66 \pm 0,18$ lag, konnte die Aktivität von PARP nach
Tacrolimus-Vorbehandlung im postischämischen Lebergewebe bei $0,26 \pm 0,07$ gemessen
werden. Dies entspricht einer Aktivitätsreduktion von PARP um 59,9% nach Tacrolimusgabe.
Dieses Ergebnis war mit einem p-Wert von 0,0834 knapp nicht signifikant.

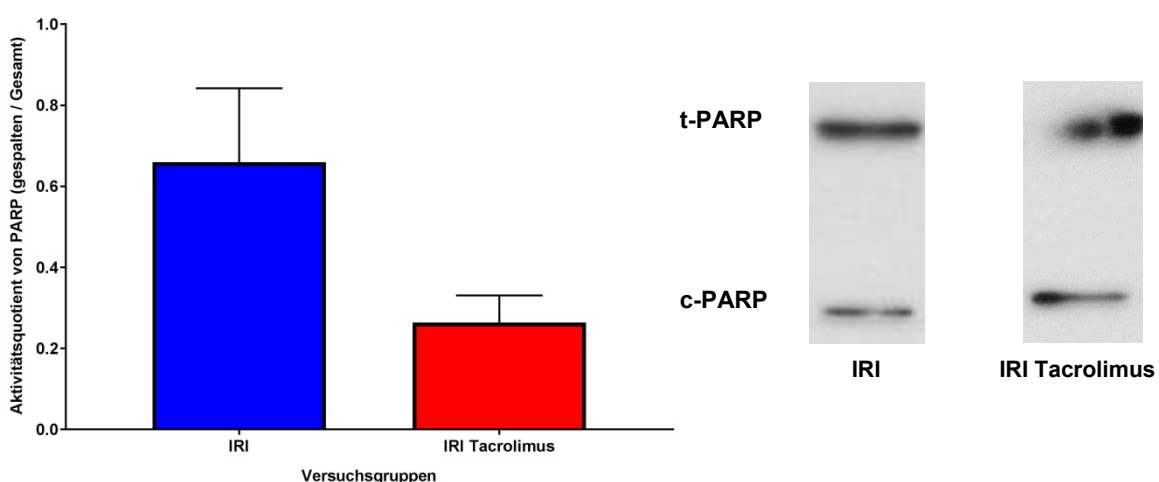


Abb. 76: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, gespalteener PARP und Gesamt-PARP im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfu-
sion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (roter Balken, IRI Tacrolimus). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Wes-
tern-Blot-Proteinbanden aktivierter, gespalteener PARP (unten, c-PARP) und Gesamt-PARP (oben, t-PARP) nach Ischämie und

Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (links, IRI) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (rechts, IRI Tacrolimus), jeweils bei 89 kDa (c-PARP) und 116 kDa (t-PARP).

4.4.4 Alteration der Serum-Leberwertkonzentrationen

Wie auch in den zuvor untersuchten Therapiegruppen erfolgte eine Blutserumanalyse nach Tacrolimus-Vorbehandlung, um Auswirkungen einer solchen Therapie auf die Nieren- und Leberfunktionsparameter darstellen und verdeutlichen zu können. Zunächst erfolgte die Auswertung des alleinigen Effekts einer Tacrolimus-Vorbehandlung auf den scheinooperierten Organismus, um somit den toxischen Faktor eines jeden Blutwerts zu präsentieren (Tab. 14). Hierbei konnten keine relevanten Unterschiede in den Konzentrationen von Kreatinin und Bilirubin nach Tacrolimus-Vorbehandlung im Vergleich zur unbehandelten, sham-operierten Gruppe festgestellt werden (Abb. 77). Auch in der Tacrolimus-Gruppe konnte, verglichen mit der unbehandelten Gruppe, einer Steigerung der Lebersyntheseleistung nach Scheinoperation beobachtet werden. So kam es zu einer um $+19,1\% \pm 3,5\%$ signifikant gesteigert messbaren Cholinesterase ($p = 0,04$). Bei den Leberenzymen GOT, GPT und GLDH kam es interessanterweise nach Tacrolimus-Behandlung zu einer Abnahme der Volumenaktivität und somit zu negativen toxischen Faktoren. Auch wenn die Ergebnisse der toxischen Faktoren nach Scheinoperation allesamt nicht signifikant waren, so konnten sie mit einer relativen Abnahme der Enzymaktivität um $-30,9\% \pm 12,5\%$ ($p = 0,26$) für die GOT, um $-33,9\% \pm 16,1\%$ ($p = 0,33$) für die GPT und um $-6,9\% \pm 14,6\%$ ($p = 0,82$) für die GLDH zumindest als leichtgradige, negative Regulationstrends betrachtet werden.

Laborchemisch untersuchte Serumparameter	Versuchsgruppen						Steigerungsfaktor von Tacrolimus nach IRI- Induktion
	<u>Sham Operation</u>			<u>IRI</u>			
	Ohne Vor- behandlung	Tacrolimus	Toxischer Faktor Tacrolimus	Ohne Vor- behandlung	Tacrolimus	Toxischer Faktor Tacrolimus	
Kreatinin (mg/dl)	0,8 ± 0	0,8 ± 0	0% ± 0%	0,8 ± 0	0,8 ± 0	0% ± 0%	0%
Bilirubin (mg/dl)	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0% ± 7,9%	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	+11,1% ± 7,8%	+33,3% ± 6,9%
GOT (U/l)	152,0 ± 34,3	105,0 ± 16,4	-30,9% ± 12,5%	794,0 ± 213,9	420,7 ± 79,5	-47,0% ± 11,7%	+300,6% ± 31,6% (***)
GPT (U/l)	121,0 ± 26,5	80,0 ± 28,5	-33,9% ± 16,1%	928,9 ± 316,9	328,7 ± 101,8	-64,6% ± 14,6% (**)	+310,8% ± 54,0% (***)
GLDH (U/l)	14,5 ± 3,9	13,5 ± 1,7	-6,9% ± 14,6%	131,3 ± 25,7	118,6 ± 32,9	-9,7% ± 14,2%	+778,5% ± 109,1% (*)
ChE (kU/l)	2,9 ± 0,1	3,4 ± 0,17	+19,1% ± 3,5% (*)	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,05	-4,1% ± 0,8%	- 18,8% ± 1,6% (***)

Tab. 14: Tabellarische Darstellung der Konzentrationen (für Kreatinin und Bilirubin) und Volumenaktivitäten (für GOT, GPT, GLDH & ChE) laborchemisch untersuchter Parameter nach Scheinoperation (Sham Operation) und nach Ischämie und Reperfusion (IRI) im Serum, jeweils ohne medikamentöse Vorbehandlung und nach Tacrolimus-Vorbehandlung. Die relative Differenz nach Tacrolimus-Vorbehandlung zu keiner Vorbehandlung ist als parameterspezifischer toxischer Faktor angegeben, jeweils pro Versuchsgruppe. Die relative Differenz nach Induktion eines Ischämie-Reperfusionsschaden und nach Tacrolimus-Vorbehandlung zur Scheinoperation nach Tacrolimus-Vorbehandlung ist als parameterspezifischer Steigerungsfaktor von Tacrolimus angegeben. Statistik (t-Test; Šidák-Test): *** entspricht einem p-Wert von < 0,001; ** entspricht einem p-Wert < 0,01; * entspricht einem p-Wert von < 0,05. Signifikanzhinweise beziehen sich auf die durch die parameterspezifischen Steigerungsfaktoren dargestellten Unterschiede. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Im Weiteren wurde der Tacrolimus-spezifische toxische Faktor nach IRI errechnet (Tab. 14). Hierbei konnte keine relevante Differenz zwischen der unbehandelten und der Tacrolimus-Gruppe in Bezug auf die Konzentrationen von Kreatinin und Bilirubin dargestellt werden (Abb. 77). Nachdem die Lebersyntheseleistung mit einer Zunahme der Volumenaktivität der ChE nach Scheinoperation durch Tacrolimus erhöht werden konnte, war nun kein signifikanter Unterschied zwischen der unbehandelten und der Tacrolimus-Gruppe nach IRI-Induktion mehr festzustellen. Tendenziell kam es nun sogar zu einer minimalen Abnahme der Cholinesterase-Mittelwerte um $-4,1\% \pm 0,8\%$ ($p = 0,14$). Erneut fanden sich Abnahmetendenzen in der Aktivität der GOT, GPT und GLDH bei Auswertung des toxischen Faktors. Während die GLDH um $9,7\% \pm 14,2\%$ ($p = 0,77$) und die GOT um $47,0\% \pm 11,7\%$ ($p = 0,17$) tendenziell, wenn auch insignifikant in deren Volumenaktivität nach Tacrolimusgabe reduziert messbar waren, war der Unterschied der GPT-Aktivität mit einem toxischen Faktor von $-64,6\% \pm 14,6\%$ hochsignifikant ($p = 0,2289$).

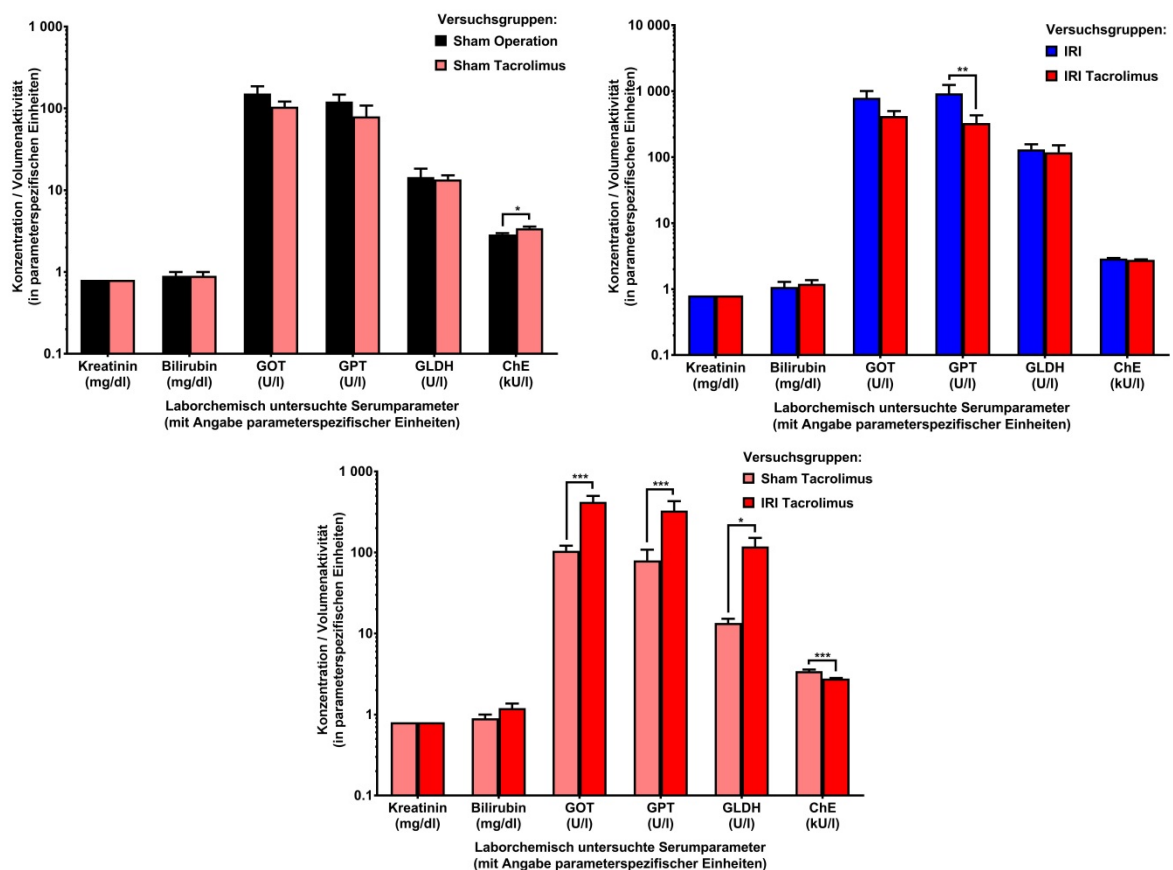


Abb. 77: Graphische, logarithmische Darstellungen der Konzentrationen (für Kreatinin und Bilirubin) und Volumenaktivitäten (für GOT, GPT, GLDH & ChE) laborchemisch untersuchter Parameter nach Scheinoperation (oben links) ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und mit Tacrolimus-Vorbehandlung (rosé Balken, Sham Tacrolimus), sowie nach Ischämie und Reperfusion (oben rechts) ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach Tacrolimus-Vorbehandlung (roter Balken, IRI Tacrolimus) im Serum, sowie (unten) nach Scheinoperation (rosé Balken, Sham Tacrolimus) und nach

Ischämie und Reperfusion (roter Balken, IRI Tacrolimus), jeweils nach Tacrolimus-Vorbehandlung. Die parameterspezifischen Einheiten sind in der X-Achsen-Beschriftung angegeben. Statistik (t-Test; Šidák-Test): *** entspricht einem p-Wert von $< 0,001$; ** entspricht einem p-Wert $< 0,01$; * entspricht einem p-Wert von $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Um nun den Tacrolimus-spezifischen Steigerungsfaktor und damit den tatsächlichen Effekt der IRI-Vorbehandlung auf die Serumparameter in der Tacrolimus-Gruppe ausrechnen zu können, erfolgte erneut der Vergleich der Blutwerte nach Tacrolimus-Vorbehandlung und IRI-Induktion mit jenen nach Scheinoperation und Tacrolimusgabe (Tab. 14). Hierbei ergab sich kein relevanter Unterschied beim Vergleich der Nierenfunktion und der hepatischen Exkretion. Die anderen untersuchten Leberwerte präsentierten sich jedoch mit signifikanten Differenzen (Abb. 77). So führte die Induktion des hepatischen IRI nach Auswertung der ChE-Volumenaktivität zu einer signifikanten Abnahme der Lebersyntheseleistung um $18,8\% \pm 1,6\%$ ($p < 0,001$). Parallel hierzu erfuhren die Volumenaktivitäten der Parameter der Leberschädigung jeweils eine signifikante Steigerung. Für die GOT lag der Steigerungsfaktor hierbei bei $+300,6\% \pm 31,6\%$ ($p < 0,001$), für die GPT lag dieser Wert bei $+310,8\% \pm 54,0\%$ ($p < 0,001$). Die Aktivität der GLDH präsentierte sich in dieser Auswertung sogar um $778,5\% \pm 109,1\%$ gesteigert ($p = 0,0259$). In der weiteren Folge erfolgte der Vergleich der soeben ermittelten Tacrolimus-spezifischen Steigerungsfaktoren mit jenen der unbehandelten Experimentalgruppen (Abb. 78). Hierbei ergab sich erneut kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den entsprechenden Steigerungsfaktoren von Kreatinin oder Bilirubin. Da sich der Steigerungsfaktor der Cholinesterase, wie vorhin dargestellt, in der Tacrolimusgruppe jedoch negativ präsentierte war der Unterschied zum unbehandelten Steigerungsfaktor mit einer relativen Abnahme um das 22,7-fache entsprechend signifikant ($p < 0,001$). Während dieses Ergebnis eher einer zunehmenden Einschränkung der Leberfunktion durch Tacrolimus nach IRI-Induktion entsprach, zeigte sich die Wirkung von Tacrolimus auf die Enzymwerterhöhung von GOT, GPT und GLDH tendenziell reduktiv. So führte die Tacrolimus-Vorbehandlung zu einer signifikanten, relativen Reduktion des Steigerungsfaktors von GOT um $28,8\% \pm 4,1\%$ ($p = 0,0190$), sowie zu einer ebenfalls signifikanten Abnahme der GPT-Erhöhung um $53,4\% \pm 4,5\%$ ($p < 0,001$). Die GLDH-Aktivitätssteigerung konnte nur insignifikant reduziert werden ($p = 0,7811$), zeigte mit einem relativen Steigerungsfaktor von $-3,4\% \pm 3,8\%$ aber eine diskrete negative Regulationstendenz. Der Vergleich der relativen Tacrolimus-spezifischen Steigerungsfaktoren von GOT, GPT und GLDH konnte im Weiteren einen signifikanten Unterschied in der Ausprägung der Steigerungsfaktorreduktionen darstellen (Abb. 78). So präsentierte sich die GPT im Vergleich zu den anderen beiden Parametern

tern der Zellschädigung signifikant stärker in ihrem Steigerungsfaktor reduziert (jeweils $p < 0,001$), während die GOT-Erhöhung ebenfalls noch signifikant stärker reduziert wurde als dies bei der GLDH der Fall war ($p < 0,001$). Somit führt die Tacrolimus-Vorbehandlung sowohl zu einer signifikanten Reduktion der GOT- und GPT-Aktivitätserhöhung nach Ischämie und Reperfusion, wobei diese für die GPT am signifikant stärksten ausfiel, als auch zu einer Abnahme der Lebersynthesfunktion.

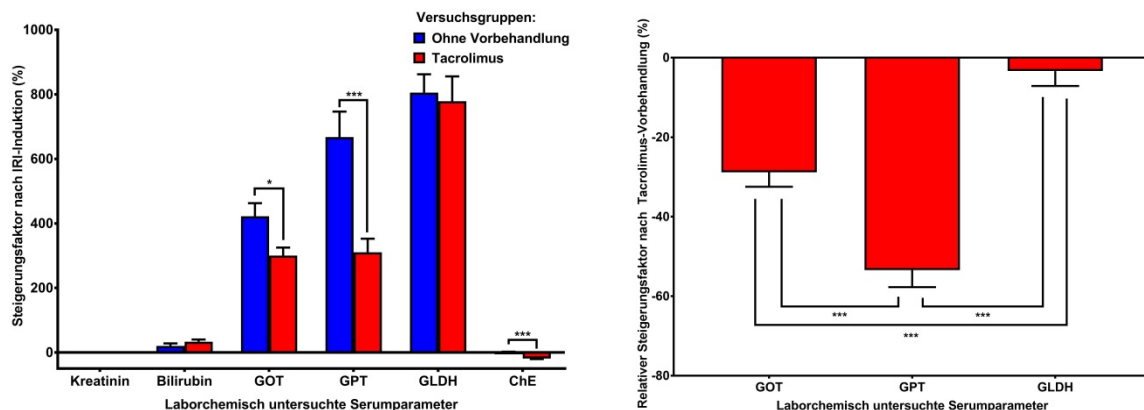


Abb. 78: Links: Graphische Darstellung der parameterspezifischen Steigerungsfaktoren der jeweiligen laborchemisch untersuchten Serumparameter nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zur Scheinoperation, jeweils ohne Vorbehandlung (blauer Balken, ohne Vorbehandlung) und mit Tacrolimus-Vorbehandlung (roter Balken, Tacrolimus). Rechts: Graphische Darstellung der parameterspezifischen relativen Steigerungsfaktoren nach Tacrolimus-Vorbehandlung der jeweiligen laborchemisch untersuchten Serumparameter als relativer Unterschied der jeweiligen Steigerungsfaktoren nach Tacrolimus-Vorbehandlung im Vergleich zu keiner Vorbehandlung. Statistik (t-Test; Šidák-Test; Tukey-Test): *** entspricht einem p-Wert von $< 0,001$; * entspricht einem p-Wert von $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

4.4.5 Substratverbrauch von Gpx4

Auch in der Tacrolimusgruppe wurde der Einfluss des applizierten Medikaments auf den oxidativen Stoffwechsel des Glutathions untersucht und der Aktivitätsquotient aus oxidiertem GSSG und reduziertem GSH nach Spektralphotometrie ausgewertet (Tab. 15).

Versuchsgruppen	Intrazellulärer Gehalt ($\mu\text{mol} / \text{g}$) von		Aktivitätsquotient der Glutathionoxidierung (GSSG / GSH)
	GSH	GSSG	
Sham Operation	$6,89 \pm 1,44$	$32,45 \pm 12,65$	$5,19 \pm 1,77$
Sham Tacrolimus	$4,89 \pm 0,54$	$35,41 \pm 9,98$	$4,64 \pm 1,04$
IRI	$5,98 \pm 0,65$	$27,23 \pm 2,00$	$4,99 \pm 0,68$
IRI Tacrolimus	$6,68 \pm 0,72$	$45,79 \pm 5,93$	$8,74 \pm 1,59$

Tab. 15: Tabellarische Darstellung des mittels Spektralphotometrie intrazellulär nachgewiesenen Gehalts von reduziertem GSH und oxidiertem GSSG nach Scheinoperation (Sham (Operation)) und nach Ischämie und Reperfusion (IRI) im Lebergewebe, jeweils ohne medikamentöse Vorbehandlung und nach Tacrolimus-Vorbehandlung, in $\mu\text{mol/g}$. Das Verhältnis von GSSG zu GSH ist als versuchsgruppenspezifischer Aktivitätsquotient der Glutathionoxidierung angegeben.

Zunächst erfolgte der Vergleich der Aktivitätsquotienten der Glutathionoxidierung in den scheinoperierten Gruppen. Hierbei zeigte sich keine signifikante Differenz ($p = 0,7959$) zwischen den Aktivitätsquotienten der unbehandelten, scheinoperierten Gruppe und jener, die mit Tacrolimus vorbehandelt wurde (Abb. 79). Im Gegensatz zu der Baicalein- und der DMSO-Gruppe war sogar ein diskreter negativer Regulationstrend nach Tacrolimusgabe um 10,7% zu beobachten. Die Mittelwerte der Aktivitätsquotienten lagen in der unbehandelten Gruppe bei $5,19 \pm 1,77$, in der Tacrolimus-Gruppe betrug dieser Wert $4,64 \pm 1,04$.

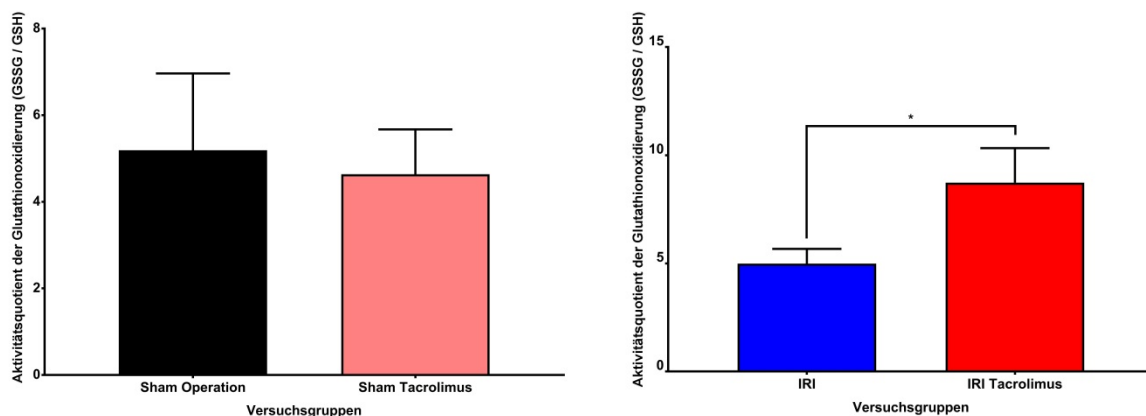


Abb. 79: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten der Glutathionoxidierung aus oxidiertem Glutathion-Disulfid (GSSG) und reduziertem Glutathion (GSH) im explantierten Lebergewebe nach spektralphotometrischer Auswertung in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation (links) ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und mit Tacrolimus-Vorbehandlung (rosé Balken, Sham Tacrolimus), sowie nach Ischämie und Reperfusion (rechts) im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach DMSO-Vorbehandlung (roter Balken, IRI Tacrolimus). Statistik (t-Test): * entspricht einem p-Wert von $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Die Auswertung der Effekte der Tacrolimus-Behandlung nach IRI präsentierte sich hierbei diametral anders (Abb. 79). Während der Aktivitätsquotient der Glutathionoxidierung in der postischämischen Leber ohne Vorbehandlung bei $4,99 \pm 0,68$ lag, wurde dieser nach Tacrolimusgabe bei $8,74 \pm 1,59$ gemessen, was einer relativen Steigerung der Glutathionoxidierung nach IRI-Induktion um 75,1% entsprach. Diese deutliche Steigerung des oxidativen Glutathionstoffwechsels präsentierte sich statistisch signifikant ($p = 0,0302$).

4.5 Effekte der kombinierten Tacrolimus- & Baicaleinvorbehandlung

4.5.1 Kreislaufparameter

Die Versuchsgruppen, welche mit Baicalein und Tacrolimus als Kombinationstherapie vorbehandelt wurden, wurden analog zu den zuvor beschriebenen Versuchsgruppen in Bezug auf die Kreislaufeffekte der Vorbehandlung untersucht. Hierbei fiel auf, dass die Sham-operierten Tiere, die mit Tacrolimus und Baicalein vorbehandelt wurden, während des gesamten

operativen Verlaufs einen deutlich und signifikant reduzierten Mitteldruck aufwiesen im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren, die keine Vorbehandlung erhielten (Abb. 80). Somit konnte die gesamte Mitteldruckkurve als signifikant reduziert errechnet werden ($p < 0,001$). Die durchschnittliche Blutdruckabnahme im Vergleich zur unbehandelten Gruppe betrug 34,6 mmHg. Ein vergleichbares, wenn auch nicht derart eindrückliches Ergebnis konnte in der IRI-Gruppe beobachtet werden. Der initial gemessene Mitteldruck bei Kanülierung lag zwar analog zu den Sham-operierten Tieren nach kombinierter Vorbehandlung um 43,3 mmHg signifikant niedriger als in der unbehandelten IRI-Gruppe ($p < 0,001$). Jedoch war bereits 30 Minuten nach Ischämieinduktion keine Signifikanz in den Kurvenunterschieden mehr zu errechnen, wenngleich die mittleren Blutdruckwerte der kombiniert therapierten IRI-Gruppe zu jedem Zeitpunkt niedriger waren als die der unbehandelten IRI-Gruppe (Abb. 80). Eine Ausnahme stellt hierbei das Zeitfenster 15 Minuten nach Reperfusion (-21,7 mmHg; $p = 0,0387$), sowie 45 Minuten nach Reperfusion (-23,7 mmHg; $p = 0,0169$) dar. Auch in dieser Versuchsgruppe war ein selbstlimitierender, signifikanter Blutdruckverlust post reperfusionem festzustellen ($p = 0,0285$).

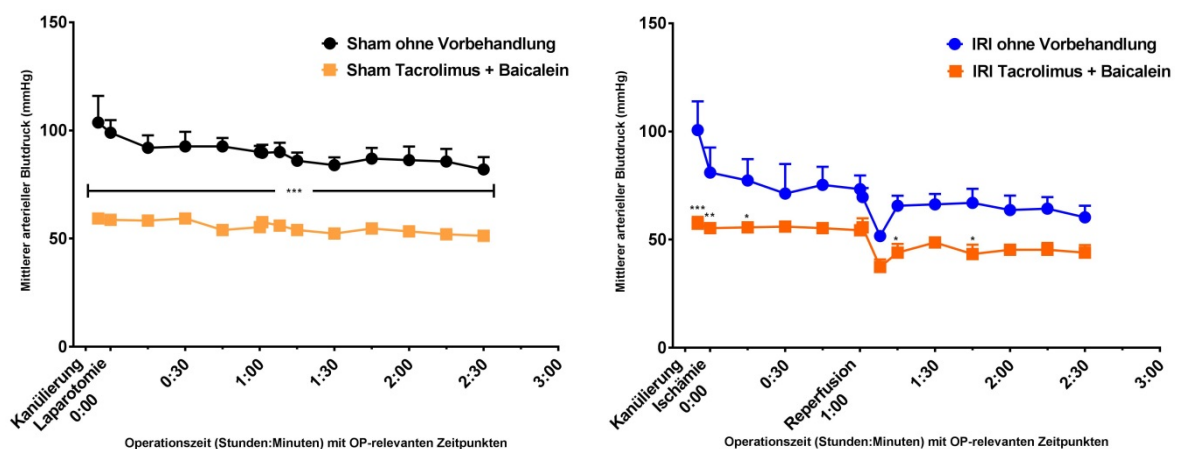


Abb. 80: Graphische Darstellung der Blutdruckkurven der Versuchsgruppen mit Scheinoperation (links) ohne Vorbehandlung (schwarze Kurve, Sham ohne Vorbehandlung) und mit kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (gelbe Kurve, Sham Tacrolimus + Baicalein), sowie mit IRI-Induktion (rechts) ohne Vorbehandlung (blaue Kurve, IRI ohne Vorbehandlung) und mit kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (orange Kurve, IRI Tacrolimus + Baicalein) im Verlauf des Experiments. Statistik (Šidák-Test): *** entspricht einem p-Wert $< 0,001$; * entspricht einem p-Wert $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den Kurven zum jeweiligen Zeitpunkt. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Ein deutlicher Unterschied zwischen den unbehandelten und kombiniert vorththerapierten Gruppen war auch nach Analyse der Pulskurven festzustellen. Sowohl bei den Sham-operierten Mäusen, als auch in der jeweiligen IRI-Gruppe waren die Mittelwerte der Pulskurven nach kombinierter Vorththerapie stets deutlich höher als bei den unbehandelten Tieren (Abb.

81). Dennoch war keine Signifikanz zwischen den jeweiligen Kurven zu errechnen. Ursächlich dafür ist eine relativ große interindividuelle Varianz der Herzfrequenzen innerhalb der kombiniert vorththerapierten Gruppen. Hierdurch ergaben sich Standardabweichungen von bis zu 68,3%, weshalb keine Signifikanz zu erzielen war.

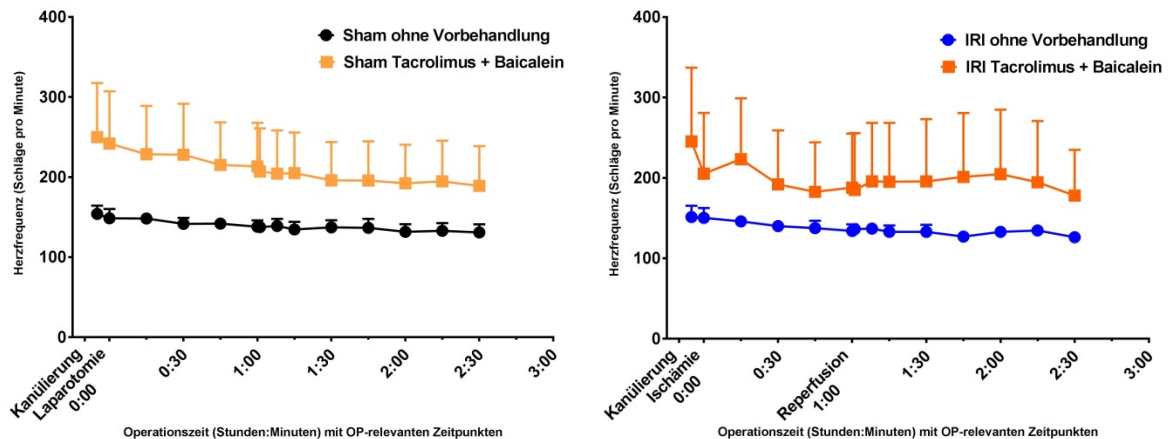


Abb. 81: Graphische Darstellung der Pulskurven der Versuchsgruppen mit Scheinoperation (links) ohne Vorbehandlung (schwarze Kurve, Sham ohne Vorbehandlung) und mit kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (gelbe Kurve, Sham Tacrolimus + Baicalein), sowie mit IRI-Induktion (rechts) ohne Vorbehandlung (blaue Kurve, IRI ohne Vorbehandlung) und mit Tacrolimus-Vorbehandlung (orange Kurve, IRI Tacrolimus) im Verlauf des Experiments. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

4.5.2 Zelltod

Mittels TUNEL-Assay wurde ebenfalls zunächst der Effekt der Kombinationsbehandlung auf die Leber der scheinoperierten Tiere (Abb. 82 links) durch Vergleich mit den unbehandelten Tieren untersucht, in der Folge analog im postischämischen Lebergewebe (Abb. 82 rechts).

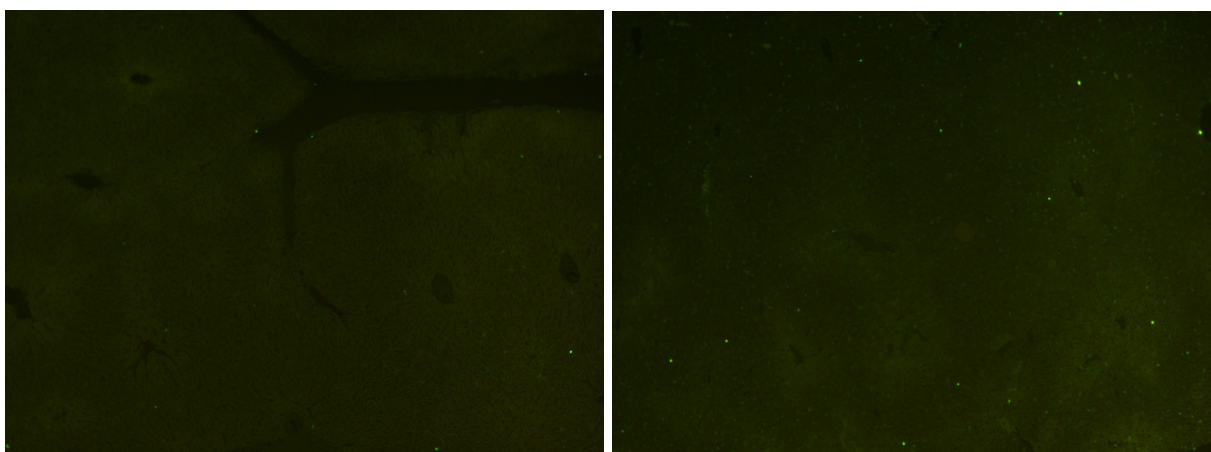


Abb. 82: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Lebergewebeschnitte nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung nach Scheinoperation (links) und nach Ischämie und Reperfusion (rechts) bei 10x-Vergrößerung und einer Exzitationswellenlänge von 450nm, sowie einer Detektionswellenlänge von 515nm. Fluoreszenzmarkierungen entsprechen abgestorbenen Zellen.

Die kombinierte Vorbehandlung mit Tacrolimus und Baicalein führte signifikanterweise zu einer Zunahme des Zelltods bei den scheinoperierten Mäusen verglichen mit den unbehandelten Tieren ($p < 0,001$) (Abb. 83). Der Flächenanteil toter Zellen stieg nach der Kombinationstherapie um absolut $1,03\% \pm 0,30\%$ auf $1,41\% \pm 0,33\%$ an, was einer relativen Erhöhung um das 2,7-fache entsprach. Jedoch verursachte die kombinierte Vorbehandlung eine signifikante Abnahme abgestorbener Zellen in den IRI-geschädigten Leberlappen im Vergleich zur untherapierten Gruppe ($p < 0,001$) (Abb. 83). Hier konnte eine absolute Reduktion der zerfallenen Zellen um $8,10\% \pm 2,27\%$ auf einen Flächenanteil von $4,90\% \pm 0,58\%$ gemessen werden, was einer relativen Reduktion von 62,3% gleichzusetzen war.

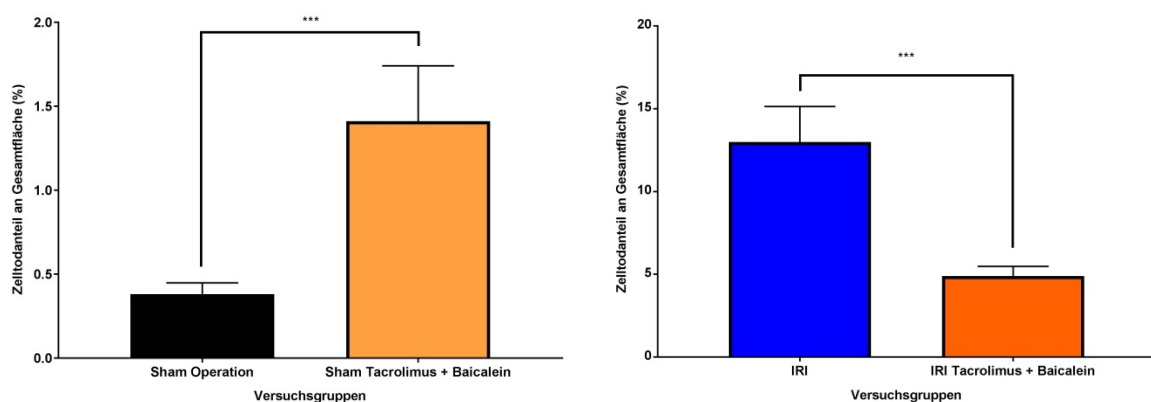


Abb. 83: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Zelltodanalyse im explantierten Lebergewebe mittels TUNEL-Assay in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation (links) ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und mit kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (gelber Balken, Sham Tacrolimus + Baicalein), sowie nach Ischämie und Reperfusion (rechts) im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (oranger Balken, IRI Tacrolimus + Baicalein). Statistik (t-Test): *** entspricht einem p-Wert von $< 0,001$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Die Skalen der Diagramme unterscheiden sich ca. um den Faktor 10.

4.5.3 Proapoptotische Enzyme

Die Untersuchung auf Aktivitätsalterationen der proapoptotischen Proteine erfolgte analog zu den restlichen Therapiegruppen für die kombinierte Tacrolimus-Baicalein-Therapie.

4.5.3.1 ERK1/2

Auch nach kombinierter Vorbehandlung mit Tacrolimus und Baicalein konnte kein signifikanter Unterschied zu der unbehandelten Versuchsgruppe nach Scheinoperation in Bezug auf die ERK1/2-Aktivität errechnet werden ($p = 0,7898$). Der ERK1/2-Aktivitätsquotient lag nach kombinierter Therapie und Sham-Operation bei $0,078 \pm 0,009$, während dieser in der unbehandelten Sham-Gruppe mit $0,085 \pm 0,022$ nur knapp erhöht war (Abb. 84).

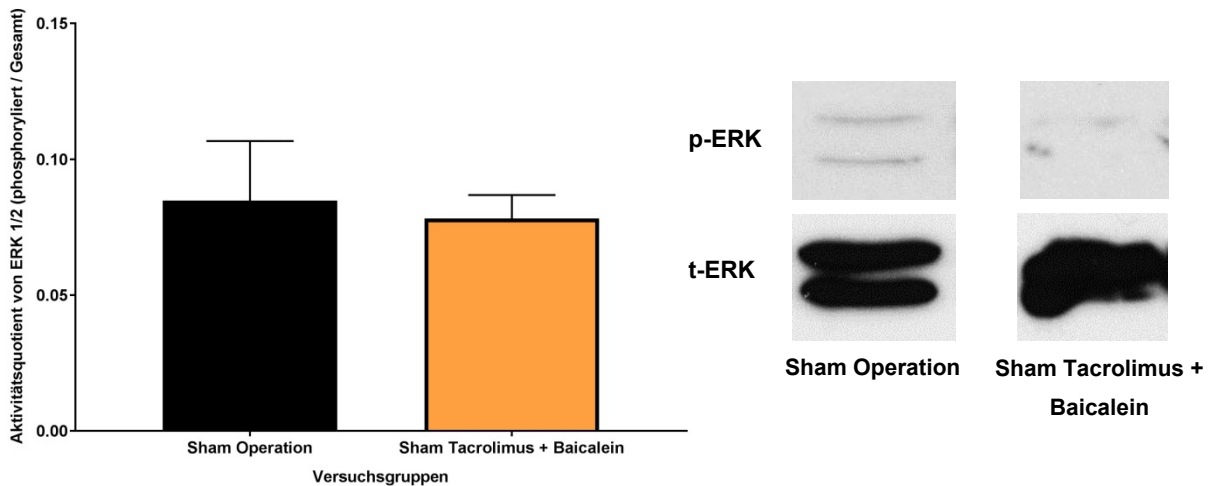


Abb. 84: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 und Gesamt-ERK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (gelber Balken, Sham Tacrolimus + Baicalein). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 (oben, p-ERK) und Gesamt-ERK (unten, t-ERK) nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (links, Sham Operation) und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (rechts, Sham Tacrolimus + Baicalein), jeweils bei 42 und 44 kDa.

Ein etwas deutlicheres Bild präsentierte sich im Vergleich der unbehandelten und kombiniert mit Tacrolimus und Baicalein vorbehandelten Versuchsgruppen nach Induktion eines IRI (Abb. 85). Der Aktivitätsquotient von ERK1/2 lag hierbei in der unbehandelten IRI-Gruppe bei $0,508 \pm 0,150$, wohingegen die Kombinationsbehandlung zu einer Abnahme der ERK1/2-Aktivität um 28,1% führte. In dieser Versuchsgruppe lag der Quotient aus phosphorylierter ERK1/2 und deren Gesamtanteil bei $0,365 \pm 0,088$. Jedoch war dieser negative Regulations-trend mit einem p-Wert von 0,4287 statistisch nicht signifikant.

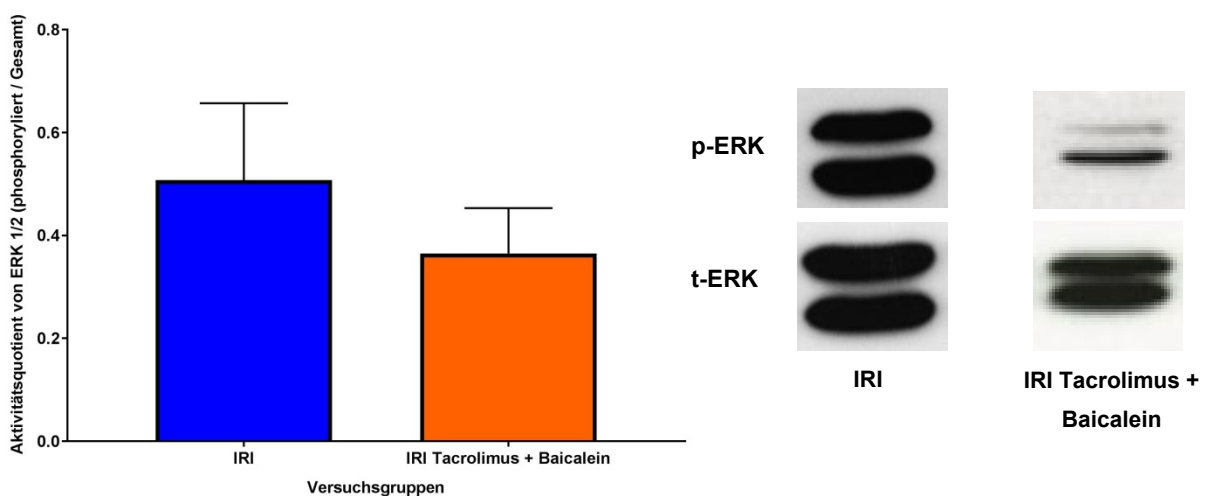


Abb. 85: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 und Gesamt-ERK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach kombinierter Tacrolimus- und Bai-

calein-Vorbehandlung (oranger Balken, IRI Tacrolimus + Baicalein). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 (oben, p-ERK) und Gesamt-ERK (unten, t-ERK) nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (links, IRI) und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (rechts, IRI Tacrolimus + Baicalein), jeweils bei 42 und 44 kDa.

4.5.3.2 SAPK/JNK

Die kombinierte Vorbehandlung der Sham-operierten Mäuse mit Baicalein und Tacrolimus führte in der Auswertung des Proteingehalts im untersuchten Lebergewebe ebenfalls zu keiner relevanten Alteration in der Aktivität der SAPK/JNK im Vergleich zur unbehandelten Versuchsgruppe (Abb. 86). Der Quotient aus phosphorylierter SAPK/JNK und deren Gesamtproteingehalt lag in der unbehandelten Gruppe nach Sham-Operation bei $0,054 \pm 0,005$. Die kombiniert vorbehandelte Gruppe wies in dieser Untersuchung eine Aktivität von $0,050 \pm 0,004$ auf. Die relative Differenz der Aktivitätsquotienten zwischen den beiden Versuchsgruppen war somit mit 8,6% marginal ($p = 0,4838$).

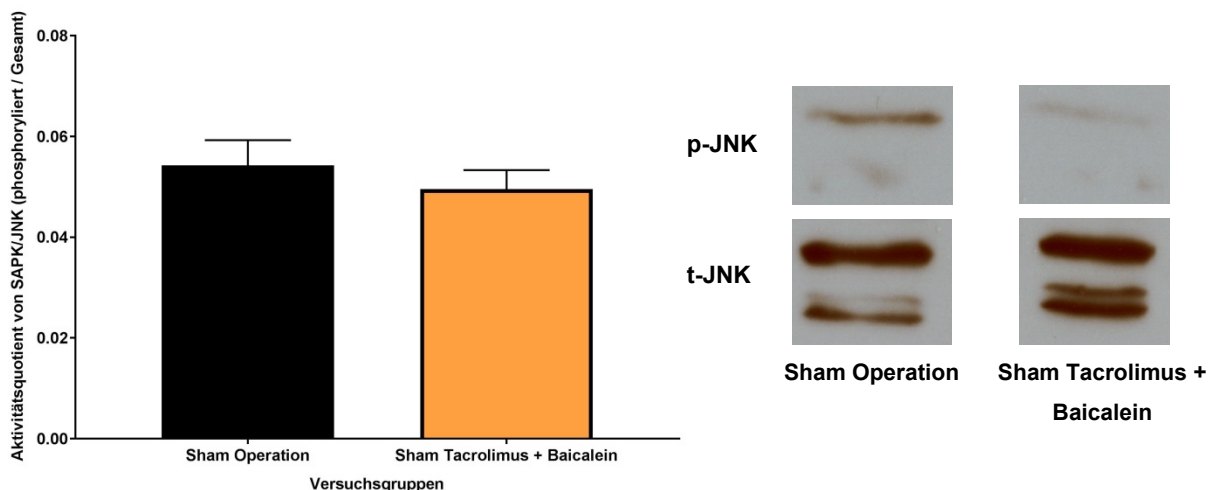


Abb. 86: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK und Gesamt-SAPK/JNK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (gelber Balken, Sham Tacrolimus + Baicalein). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK (oben, p-JNK) und Gesamt-SAPK/JNK (unten, t-JNK) nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (links, Sham Operation) und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (rechts, Sham Tacrolimus + Baicalein), jeweils bei 46 und 54 kDa.

Nach kombinierter Baicalein-Tacrolimus-Vorbehandlung im postischämischen Lebergewebe konnte im Vergleich zur unbehandelten IRI-Versuchsgruppe ein deutlich negativer Regulationstrend von -34,5 % nachgewiesen werden, jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0,3017$) (Abb. 87). Während der Mittelwert des errechneten Aktivitätsquotienten der SAPK/JNK in der unbehandelten postischämischen Leber bei $0,892 \pm 0,201$ lag, betrug dieser nach oben beschriebener, kombinierter Vorbehandlung $0,585 \pm 0,202$.

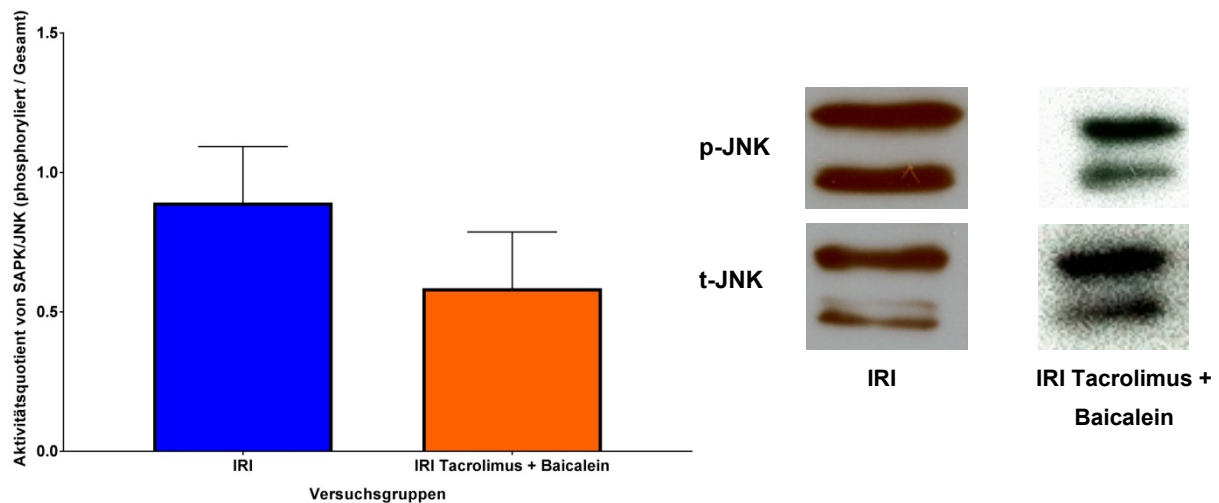


Abb. 87: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus phosphorylierter SAPK/JNK und Gesamt-SAPK/JNK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach Kombinationsbehandlung (oranger Balken, IRI Tacrolimus + Baicalein). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden phosphorylierter SAPK/JNK (oben, p-JNK) und Gesamt-SAPK/JNK (unten, t-JNK) nach IRI ohne Vorbehandlung (links, IRI) und nach Kombinationsbehandlung (rechts, IRI Tacrolimus + Baicalein), jeweils bei 46 und 54 kDa.

4.5.3.3 Caspase-3

Analog wurden ebenfalls die gewonnen Ergebnisse der Aktivitätsauswertung der Caspase-3 nach Kombinationsbehandlung mit jenen der entsprechenden unbehandelten Gruppen verglichen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass der Aktivitätsquotient aus aktivierter Caspase-3 und GAPDH im Lebergewebe nach Scheinoperation bei den unbehandelten Tieren einen Wert von $0,061 \pm 0,009$ aufwies, während die Caspase-3-Aktivität der kombiniert vorbehandelten Sham-Gruppe bei $0,057 \pm 0,007$ lag (Abb. 88). Diese sehr diskrete Aktivitätsabnahme um 7,2% war mit einem p-Wert von 0,7045 als insignifikant zu werten.

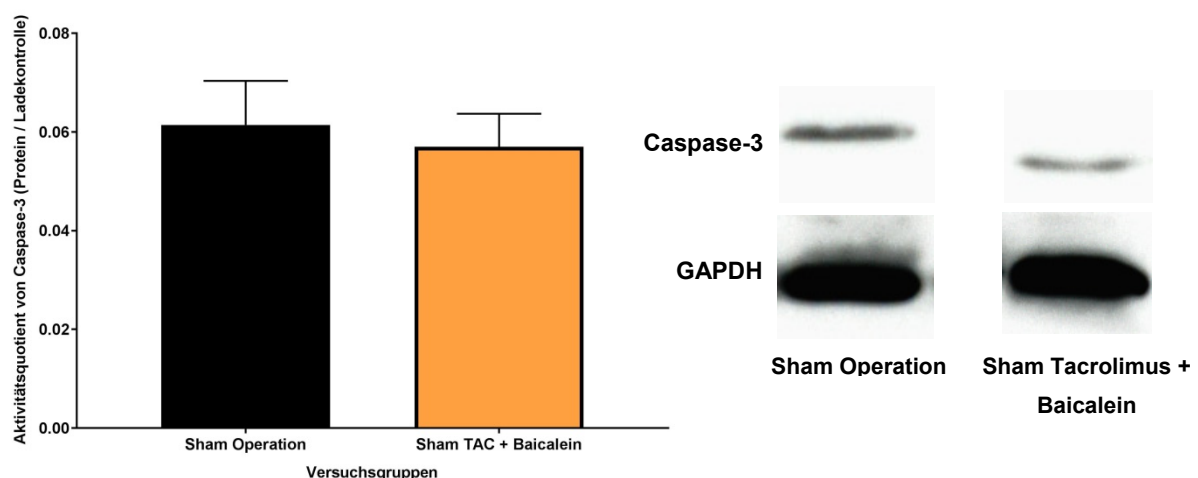


Abb. 88: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter Caspase-3 und deren Ladekontrolle GAPDH im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation

ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (gelber Balken, Sham Tacrolimus + Baicalein). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter Caspase-3 (oben, Caspase-3) und deren Ladekontrolle GAPDH (unten, GAPDH) nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (links, Sham Operation) und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (rechts, Sham Tacrolimus + Baicalein), jeweils bei 19 kDa (Caspase-3) und 37 kDa (GAPDH).

Ein ungleich deutlicheres Ergebnis konnte im Rahmen der Caspase-3-Aktivitätsauswertung nach Induktion eines hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens festgestellt werden (Abb. 89). Der Aktivitätsquotient der Caspase-3, welcher im postischämischen Gewebe der unbehandelten Gruppe bei $0,745 \pm 0,034$ lag, konnte durch die Vorbehandlung mit Tacrolimus und Baicalein auf $0,304 \pm 0,050$ gesenkt werden. Dies entsprach einer Aktivitätsreduktion um 59,2%, was als statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$) zu werten war.

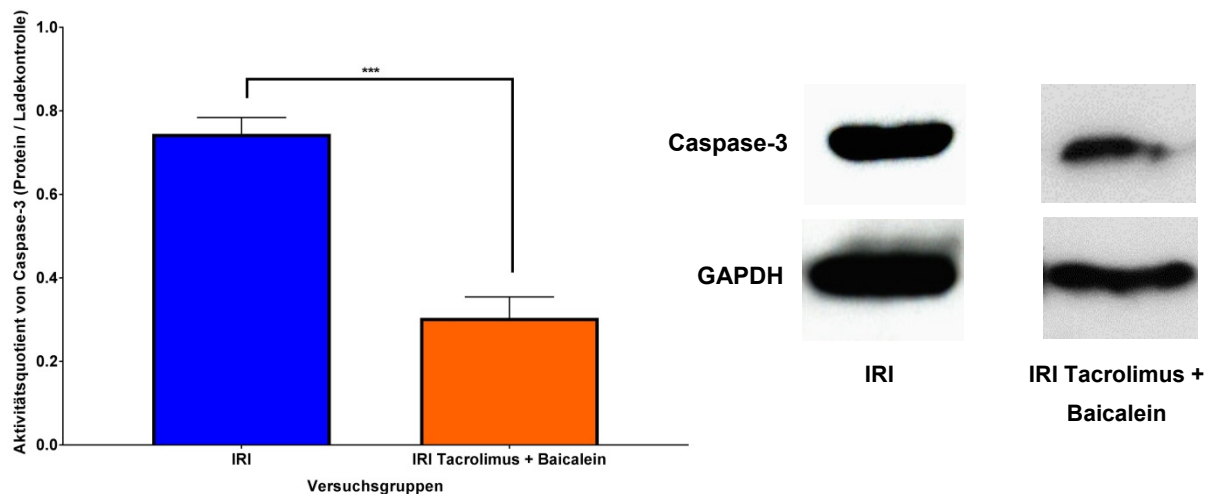


Abb. 89: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter Caspase-3 und deren Ladekontrolle GAPDH im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (oranger Balken, IRI Tacrolimus + Baicalein). Statistik (t-Test): *** entspricht einem p-Wert von $< 0,001$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter Caspase-3 (oben, Caspase-3) und deren Ladekontrolle (unten, GAPDH) nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (links, IRI) und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (rechts, IRI Tacrolimus + Baicalein), jeweils bei 19 kDa (Caspase-3) und 37 kDa (GAPDH).

4.5.3.4 PARP

Die Aktivitätsmessung von PARP erbrachte bei den scheinooperierten Versuchstieren bereits einen diskreten, statistisch nicht signifikanten ($p = 0,3041$), negativen Regulationstrend von 14,6% nach kombinierter Vorbehandlung im Vergleich zu der unbehandelten Experimentalgruppe (Abb. 90). Während die Aktivität von PARP in der unbehandelten Versuchsgruppe bei $0,082 \pm 0,008$ zu messen war, lag dieser Wert in den Lebern der kombiniert vorbehandelten Mäusen in der Höhe von $0,067 \pm 0,007$.

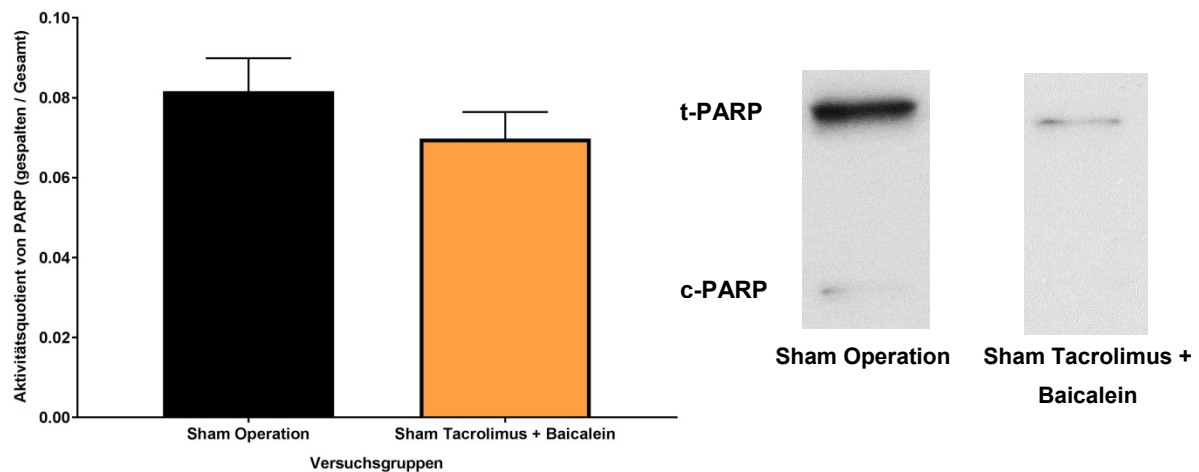


Abb. 90: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, gespalteener PARP und Gesamt-PARP im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (gelber Balken, Sham Tacrolimus + Baicalein). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, gespalteener PARP (unten, c-PARP) und Gesamt-PARP (oben, t-PARP) nach Scheinoperation ohne Vorbehandlung (links, Sham Operation) und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (rechts, Sham Tacrolimus + Baicalein), jeweils bei 89 kDa (c-PARP) und 116 kDa (t-PARP).

Nach Induktion eines hepatischen IRI zeigte sich hierbei jedoch ein deutlich signifikanter Unterschied (Abb. 91). Das postischämische Lebergewebe in der unbehandelten Gruppe wies einen PARP-Aktivitätsquotienten von $0,660 \pm 0,182$ auf. Im Vergleich hierzu bewirkte die kombinierte Vorbehandlung mit Tacrolimus und Baicalein eine deutliche Aktivitätsreduktion von PARP um 80,1% auf $0,131 \pm 0,060$. Diese Abnahme der PARP-Aktivität konnte mit einem p-Wert von 0,0262 als statistisch signifikant errechnet werden.

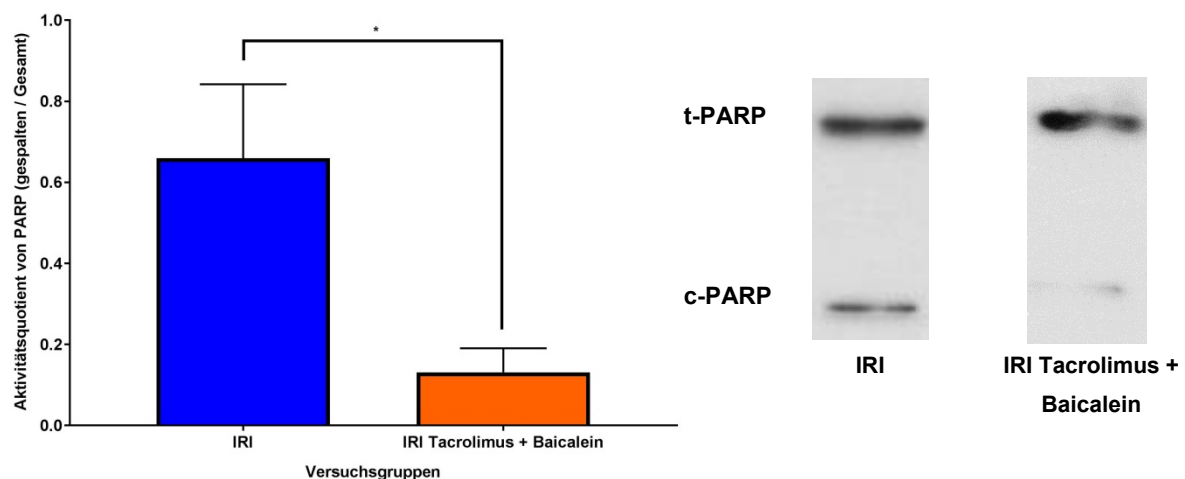


Abb. 91: Links: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, gespalteener PARP und Gesamt-PARP im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (oranger Balken, IRI Tacrolimus + Baicalein). Statistik (t-Test): * entspricht einem p-Wert von $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben. Rechts: Aufnahmen exemplarisch ausgewählter Western-Blot-Proteinbanden aktivierter, gespalteener PARP

(unten, c-PARP) und Gesamt-PARP (oben, t-PARP) nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (links, IRI) und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (rechts, IRI Tacrolimus + Baicalein), jeweils bei 89 kDa (c-PARP) und 116 kDa (t-PARP).

4.5.4 Alteration der Serum-Leberwertkonzentrationen

Im Folgenden wurde erneut zunächst mittels Vergleich der Blutwerte nach Scheinoperation und kombinierter Vorbehandlung mit jenen nach Scheinoperation ohne medikamentöse Therapie der toxischer Faktor der Kombinationstherapie anhand der Serumparameter untersucht (Tab. 16). Hierbei war erneut keine relevante Differenz der biliären Exkretion oder der Nierenfunktion festzustellen. Wie schon in den Vorgruppen der jeweiligen Monotherapien (vgl. 4.2.4 & 4.4.4) führte die Kombinationstherapie ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der Volumenaktivität der Cholinesterase in der scheinooperierten Versuchsgruppe (Abb. 92). Der toxische Faktor der ChE, der in diesem Falle mit einer protektiven Synthesezunahme einherging, lag somit bei $+21,7\% \pm 3,8\%$ ($p = 0,02$). Im Gegensatz zur alleinigen Tacrolimusgabe war nach Kombinationsbehandlung erneut eine Zunahme der Leberzellschädigungsparameter GOT, GPT und GLDH zu verzeichnen. Während die Volumenaktivität der GPT um $46,3\% \pm 13,3\%$ nur insignifikant, aber tendenziell gesteigert gemessen wurde ($p = 0,14$), waren bei der Auswertung von GPT und GLDH signifikante Steigerungen darzustellen. So führte die kombinierte Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung in Bezug auf die Volumenaktivität der GOT zu einer Steigerung um $282,4\% \pm 37,4\%$ ($p < 0,001$), bei der GLDH fiel der toxische Faktor mit signifikanten $+417,2\% \pm 78,8\%$ ($p = 0,02$) sogar noch höher aus.

Laborchemisch untersuchte Serumparameter	Versuchsgruppen						Steigerungsfaktor von Tacrolimus + Baicalein nach IRI- Induktion
	Sham Operation			IRI			
	Ohne Vor- behandlung	Tacrolimus + Baicalein	Toxischer Faktor Tacrolimus + Baicalein	Ohne Vor- behandlung	Tacrolimus + Baicalein	Toxischer Faktor Tacrolimus + Baicalein	
Kreatinin (mg/dl)	0,8 ± 0	0,8 ± 0	0% ± 0%	0,8 ± 0	0,8 ± 0	0% ± 0%	0%
Bilirubin (mg/dl)	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	+7,4% ± 10,0%	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,2	-7,4% ± 7,7%	+3,4% ± 6,6%
GOT (U/l)	152,0 ± 34,3	581,3 ± 92,2	+282,4% ± 37,4% (***)	794,0 ± 213,9	1455,4 ± 313,7	+83,3% ± 18,1% (*)	+150% ± 21,3% (*)
GPT (U/l)	121,0 ± 26,5	177,0 ± 8,5	+46,3% ± 13,3%	928,9 ± 316,9	1235,3 ± 417,7	+33,0% ± 23,0%	+597,9% ± 96,4% (**)
GLDH (U/l)	14,5 ± 3,9	75,0 ± 19,4	+417,2% ± 78,8% (*)	131,3 ± 25,7	394,4 ± 152,2	+200,4% ± 44,4%	+425,9% ± 77,3%
ChE (kU/l)	2,9 ± 0,1	3,5 ± 0,2	+21,7% ± 3,8% (*)	2,9 ± 0,1	3,7 ± 0,1	+27,2% ± 1,4% (***)	+5,4% ± 1,7%

Tab. 16: Tabellarische Darstellung der Konzentrationen (für Kreatinin und Bilirubin) und Volumenaktivitäten (für GOT, GPT, GLDH & ChE) laborchemisch untersuchter Parameter nach Scheinoperation (Sham Operation) und nach Ischämie und Reperfusion (IRI) im Serum, jeweils ohne medikamentöse Vorbehandlung und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung. Die relative Differenz nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung zu keiner Vorbehandlung ist als parameterspezifischer toxischer Faktor angegeben, jeweils pro Versuchsgruppe. Die relative Differenz nach Induktion eines Ischämie-Reperfusionsschaden und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung zur Scheinoperation nach kombinierter Vorbehandlung ist als parameterspezifischer Steigerungsfaktor von Tacrolimus + Baicalein angegeben. Statistik (t-Test; Šidák-Test): *** entspricht einem p-Wert $< 0,001$; ** entspricht einem p-Wert von $< 0,01$; * entspricht einem p-Wert $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf die durch die parameterspezifischen Steigerungsfaktoren dargestellten Unterschiede. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Auch bei dieser Auswertung des spezifischen toxischen Faktors der Kombinationstherapie nach IRI-Induktion war kein relevanter Unterschied in der Analyse von Kreatinin und Bilirubin festzustellen (Tab. 16). Nun konnte ein signifikanter Anstieg der ChE nach IRI-Induktion und kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Therapie dargestellt werden ($p < 0,001$). So präsentierte sich die entsprechende Volumenaktivität des Syntheseparameters um $27,2\% \pm 1,4\%$ gesteigert (Abb. 92). Auch bei der Analyse von GOT, GPT und GLDH konnte eine Enzymaktivitätssteigerung nach Ischämie und Reperfusion mit kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung beobachtet werden. Allerdings lagen für die GPT mit $+33,0\% \pm 23,0\%$ ($p = 0,56$) und für die GLDH mit $+425,9\% \pm 77,3\%$ ($p = 0,06$) lediglich deutlich positive Regulationstrends vor, da keine statistische Signifikanz erzielt werden konnte. Statistisch signifikant hingegen präsentierte sich der Unterschied in der GOT-Enzymaktivitätsausprägung ($p = 0,0396$). Hier konnte nach IRI-Induktion in der kombiniert vorbehandelten Versuchsgruppe eine Steigerung um $83,3\% \pm 18,1\%$ verzeichnet werden.

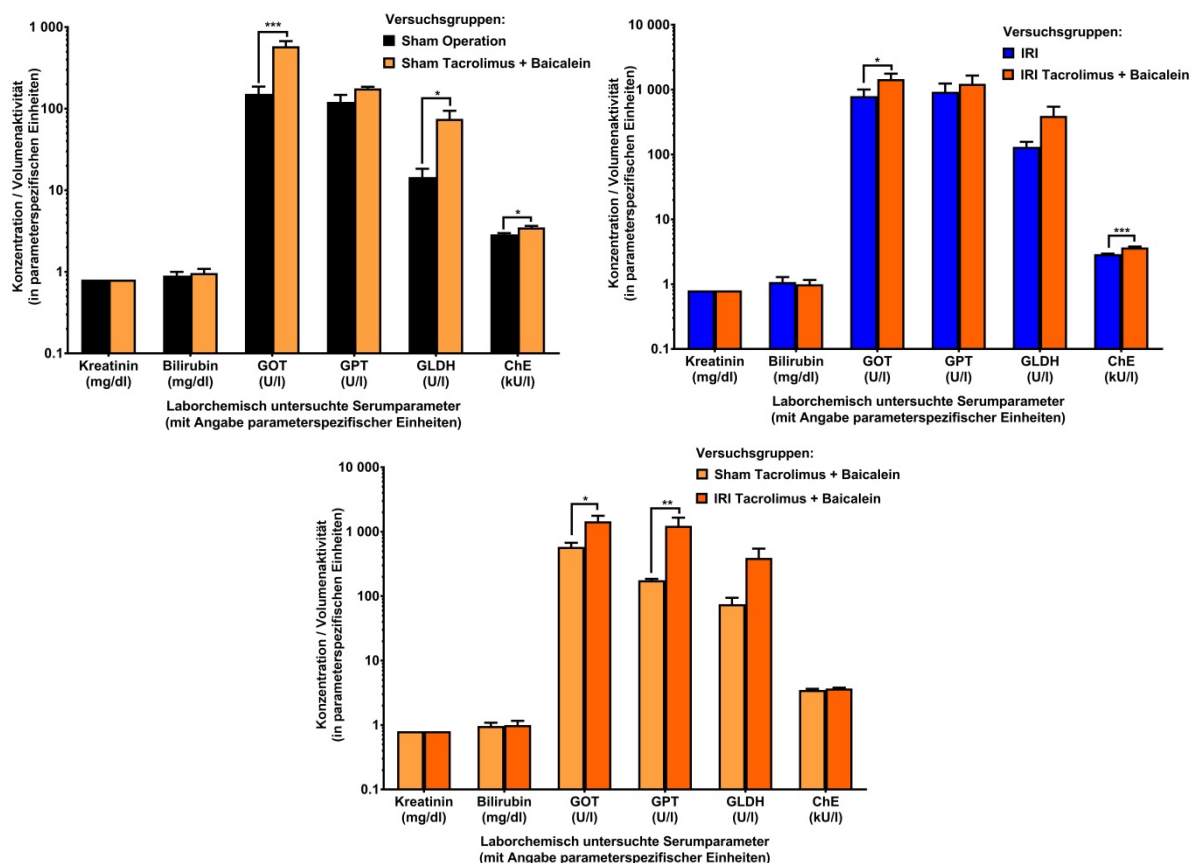


Abb. 92: Graphische, logarithmische Darstellungen der Konzentrationen (für Kreatinin und Bilirubin) und Volumenaktivitäten (für GOT, GPT, GLDH & ChE) laborchemisch untersuchter Parameter nach Scheinoperation (oben links) ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und mit kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (gelber Balken, Sham Tacrolimus + Baicalein), sowie nach Ischämie und Reperfusion (oben rechts) ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (oranger Balken, IRI Tacrolimus + Baicalein) im Serum, sowie (unten) nach Scheinoperation (gelber Balken, Sham Tacrolimus + Baicalein) und nach Ischämie und Re-

perfusion (oranger Balken, IRI Tacrolimus + Baicalein), jeweils nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung. Die parameterspezifischen Einheiten sind in der X-Achsen-Beschriftung angegeben. Statistik (t-Test; Šidák-Test): *** entspricht einem p-Wert von $< 0,001$; ** entspricht einem p-Wert $< 0,01$; * entspricht einem p-Wert von $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Der tatsächliche Effekt der Induktion eines Ischämie-Reperfusionsschadens auf die kombiniert vorbehandelten Versuchstiere wurde in der weiteren Folge erneut durch Errechnung des spezifischen Steigerungsfaktors der kombinierten Tacrolimus-Baicalein-Therapie ausgewertet (Tab. 16). Hierzu erfolgte der Vergleich der entsprechenden Serumparameter nach Induktion des Ischämie-Reperfusionsschaden mit den scheinoperierten Tieren, jeweils nach kombinierter Vortherapie. Hierbei konnte erneut kein relevanter Unterschied in der Ausprägung der Konzentrationen von Bilirubin und Kreatinin festgestellt werden (Abb. 92). Da sowohl in der kombiniert vorbehandelten Sham-, als auch in der IRI-Gruppe eine signifikante Syntheseleistungssteigerung im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Versuchstieren festgestellt werden konnte, war der Steigerungsfaktor der ChE zwischen den scheinoperierten und postischämischen Versuchsgruppen nach jeweiliger kombinierter Vortherapie mit $+5,4\% \pm 1,7\%$ ($p = 0,4240$) nun nicht mehr signifikant. Eine deutliche Steigerung der Volumenaktivität konnte in diesem Zusammenhang jedoch bei der Evaluation der Leberzellschädigungsparameter beobachtet werden. Während die GLDH zwar um $425,9\% \pm 77,3\%$ deutlich gesteigert gemessen werden konnte, dies mit einem p-Wert von 0,2216 jedoch statistisch nicht signifikant war, konnten bei der Auswertung der GOT und GPT deutliche und signifikante Unterschiede dargestellt werden. So wurde die Volumenaktivität der GOT im Serum nach Induktion des Ischämie-Reperfusionsschadens um $150\% \pm 21,3\%$ gesteigert ($p = 0,0282$), der Steigerungsfaktor der GPT fiel mit $+597,9\% \pm 96,4\%$ ($p = 0,0060$) sogar noch deutlicher aus. Im Weiteren erfolgte der Vergleich des spezifischen Steigerungsfaktors der Kombinationstherapie mit jenem der unbehandelten Versuchsgruppen (Abb. 93). Erneut ergab dieser Vergleich keine relevanten Unterschiede zwischen den Steigerungsfaktoren von Kreatinin, Bilirubin, sowie der Cholinesterase (vgl. 4.2.4 & 4.3.4). Im Gegensatz hierzu konnten allerdings deutliche Abnahmen der Steigerungsfaktoren von GOT, GPT und GLDH beobachtet werden. So fiel die Volumenaktivitätssteigerung der GPT nach IRI-Induktion und kombinierter Vorbehandlung um $10,4\% \pm 5,6\%$ vermindert aus als in der unbehandelten Versuchsgruppe. Dieses Ergebnis besaß jedoch keine statistische Signifikanz ($p = 0,5287$). Statistisch hochsignifikant präsentierten sich allerdings die relativen Steigerungsfaktoren der GOT und GLDH (jeweils $p < 0,001$). Die messbare Enzymaktivitätszunahme konnte postischäm

somit nach kombinierter Vorbehandlung um $47,1\% \pm 3,4\%$ für die GLDH reduziert werden, im Rahmen der GOT-Messung lag der relative Steigerungsfaktor sogar bei hochsignifikanten - $64,4\% \pm 3,8\%$. Ein Vergleich dieser relativen Steigerungsfaktoren der Leberzellschädigungsparameter nach kombinierter Baicalein-Tacrolimus-Vorbehandlung konnte zeigen, dass die Abnahme der Volumenaktivitätssteigerung der GOT und GLDH signifikant stärker ausfiel als jene der GPT (jeweils $p < 0,001$), wobei die Abnahme bei der GOT am stärksten ausfiel (Abb. 93). Der relative Steigerungsfaktor der GOT fiel in diesem Zusammenhang sogar signifikant negativer aus als jener der GLDH ($p = 0,0164$). Somit konnte dargestellt werden, dass die kombinierte Vorbehandlung mit Tacrolimus und Baicalein die leberzellschädigenden Serumeffekte nach Ischämie und Reperfusion reduziert, signifikanterweise im Rahmen der GOT- und GLDH-Ausprägung, wobei bei der GOT dieser Effekt am signifikant stärksten ausfällt.

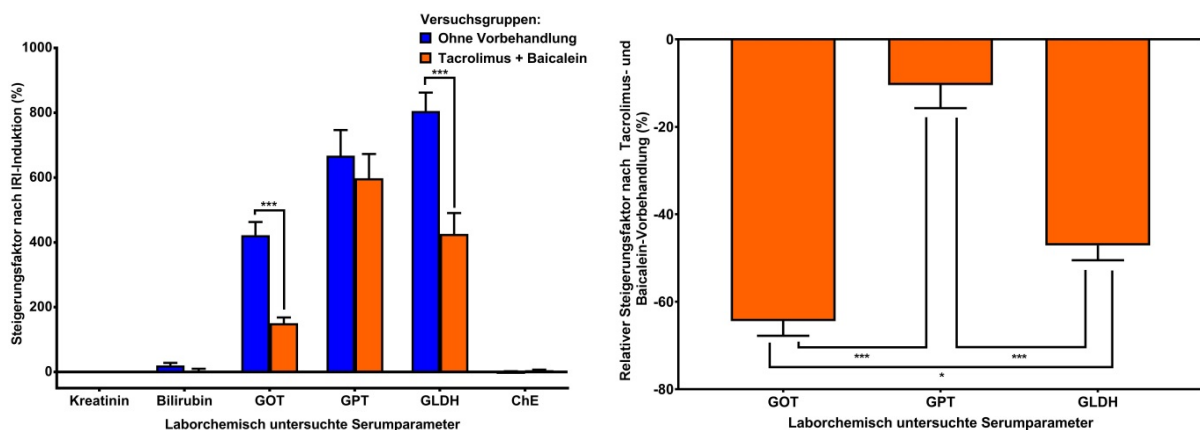


Abb. 93: Links: Graphische Darstellung der parameterspezifischen Steigerungsfaktoren der jeweiligen laborchemisch untersuchten Serumparame-ter nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zur Scheinoperation, jeweils ohne Vorbe-handlung (blauer Balken, ohne Vorbehandlung) und mit kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (oranger Balken, Tacrolimus + Baicalein). Rechts: Graphische Darstellung der parameterspezifischen relativen Steigerungsfaktoren nach Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung der jeweiligen laborchemisch untersuchten Serumparame-ter als relativer Unterschied der jeweiligen Steigerungsfaktoren nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung im Vergleich zu keiner Vorbehandlung. Statistik (Šidák-Test; Tukey-Test): *** entspricht einem p-Wert von $< 0,001$; * entspricht einem p-Wert von $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

4.5.5 Substratverbrauch von Gpx4

Die kombinierte Vorbehandlung mit Tacrolimus und Baicalein wurde im Folgenden in Bezug auf deren Auswirkung auf den Glutathionstoffwechsel untersucht. Hierzu wurde erneut der intrazelluläre Gehalt von GSH und GSSG spektralphotometrisch erfasst und durch Errech-nung des Aktivitätsquotienten der Glutathionoxidierung ausgewertet (Tab. 17).

Versuchsgruppen	Intrazellulärer Gehalt ($\mu\text{mol} / \text{g}$) von		Aktivitätsquotient der Glutathionoxidierung (GSSG / GSH)
	<u>GSH</u>	<u>GSSG</u>	
Sham Operation	$6,89 \pm 1,44$	$32,45 \pm 12,65$	$5,19 \pm 1,77$
Sham Tacrolimus + Baicalein	$5,43 \pm 0,37$	$16,21 \pm 3,54$	$2,97 \pm 0,56$
IRI	$5,98 \pm 0,65$	$27,23 \pm 2,00$	$4,59 \pm 0,68$
IRI Tacrolimus + Baicalein	$4,58 \pm 0,49$	$32,81 \pm 5,05$	$7,17 \pm 0,70$

Tab. 17: Tabellarische Darstellung des mittels Spektralphotometrie intrazellulär nachgewiesenen Gehalts von reduziertem GSH und oxidiertem GSSG nach Scheinoperation (Sham (Operation)) und nach Ischämie und Reperfusion (IRI) im Lebergewebe, jeweils ohne medikamentöse Vorbehandlung und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung, in $\mu\text{mol/g}$. Das Verhältnis von GSSG zu GSH ist als versuchsgruppenspezifischer Aktivitätsquotient der Glutathionoxidierung angegeben.

Die Aktivitätsquotienten der Glutathionoxidierung der scheinooperierten Gruppen wurden daher erneut miteinander verglichen. Die unbehandelte, scheinooperierte Gruppe zeigte hierbei einen Quotienten von $5,19 \pm 1,77$, im kombiniert vorbehandelten Gewebe konnte ein Wert von $2,97 \pm 0,56$ errechnet werden (Abb. 94). Somit konnte ein tendenzielles Absinken der oxidativen Aktivität im scheinooperierten Gewebe nach Kombinationstherapie um 42,7% im Vergleich zur medikamentös unbehandelten Versuchsgruppe beschrieben werden, wenngleich keine statistische Signifikanz ($p = 0,3493$) nachgewiesen werden konnte.

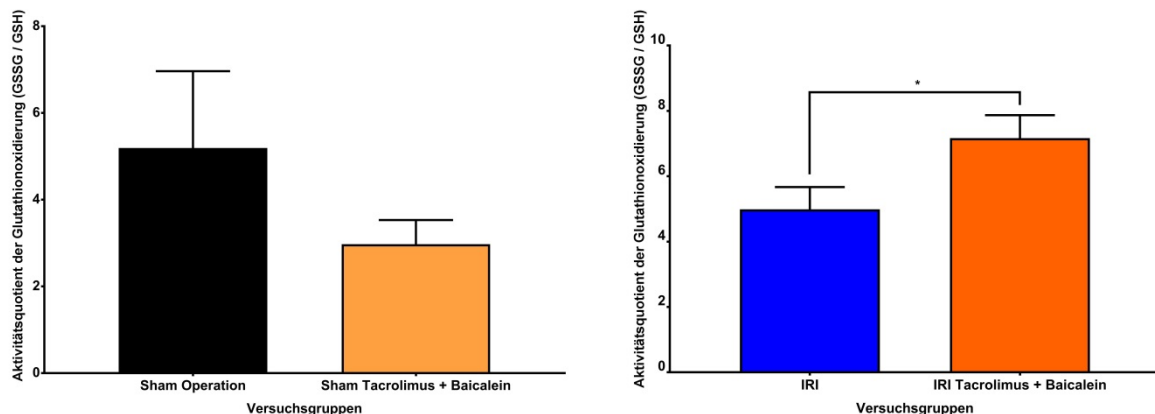


Abb. 94: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten der Glutathionoxidierung aus oxidiertem Glutathion-Disulfid (GSSG) und reduziertem Glutathion (GSH) im explantierten Lebergewebe nach spektralphotometrischer Auswertung in den Versuchsgruppen nach Scheinoperation (links) ohne Vorbehandlung (schwarzer Balken, Sham Operation) und mit kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (gelber Balken, Sham Tacrolimus + Baicalein), sowie nach Ischämie und Reperfusion (rechts) im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI) und nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (oranger Balken, IRI Tacrolimus + Baicalein). Statistik (t-Test): * entspricht einem p-Wert von $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Nach Induktion des hepatischen IRI zeigte sich ein deutlich unterschiedliches Ergebnis (Abb. 94). Erneut konnte die oxidative Aktivität im Glutathionmetabolismus des postischämischen

Lebergewebes nach kombinierter Vorbehandlung mit Tacrolimus und Baicalein im Vergleich zur unbehandelten Gruppe als deutlich gesteigert nachgewiesen werden, in diesem Fall um 43,7%. So konnte die Kombinationsvorbehandlung den Aktivitätsquotienten von $4,99 \pm 0,68$ im medikamentennaiven Gewebe auf $7,17 \pm 0,70$ steigern. Dieser Unterschied war mit einem p-Wert von 0,0422 als statistisch signifikant einzustufen.

4.6 Vergleichende Zusammenfassung der Ergebnisse nach Induktion des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden

Um die diversen Effekte der verschiedenen, angewandten Therapien untereinander adäquat vergleichen zu können, folgen zum besseren Verständnis für sämtliche untersuchte Parameter gruppenspezifische Vergleiche nach Induktion des hepatischen IRI.

4.6.1 Kreislaufparameter

Es konnte festgestellt werden, dass während des Großteils der Mitteldruckkurvenverläufe kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen zu evaluieren ist (Abb. 95). Alle Gruppen wiesen ein abnehmendes Kurvenprofil auf, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Die größte Spanne zwischen Blutdruck zum Start des Experiments und jenem zum Ende konnte in der Tacrolimusgruppe festgestellt werden und ist vor allen Dingen dadurch erklärbar, dass die Mitteldruckwerte der Tacrolimusgruppe zu Beginn der Operation signifikant höher war als die der Gruppe mit kombinierter Tacrolimus und Baicalein-Vorbehandlung ($p = 0,002$), sowie der DMSO-Gruppe ($p < 0,001$). In beiden Fällen war jedoch bereits 15 Minuten nach Ischämieinduktion an der Leber keine signifikante Blutdruckdifferenz mehr festzustellen.

Im weiteren Verlauf war bei allen Versuchsgruppen ein selbstlimitierender Blutdruckabfall zu beobachten, welcher seinen minimalen Mitteldruck kurz nach Reperfusion erreichte und nach t-Test in allen Versuchsgruppen signifikant war. 15 Minuten nach Reperfusion konnten wieder Mitteldruckwerte gemessen werden, die sich in keiner der genannten Versuchsgruppen mehr signifikant von den vor Reperfusion gemessenen Blutdruckwerten unterschieden. In der weiteren Folge waren lediglich vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen der Tacrolimus- und der kombinierten Therapiegruppe festzustellen ($p = 0,0146 - 0,0094$; siehe Abb. 95).

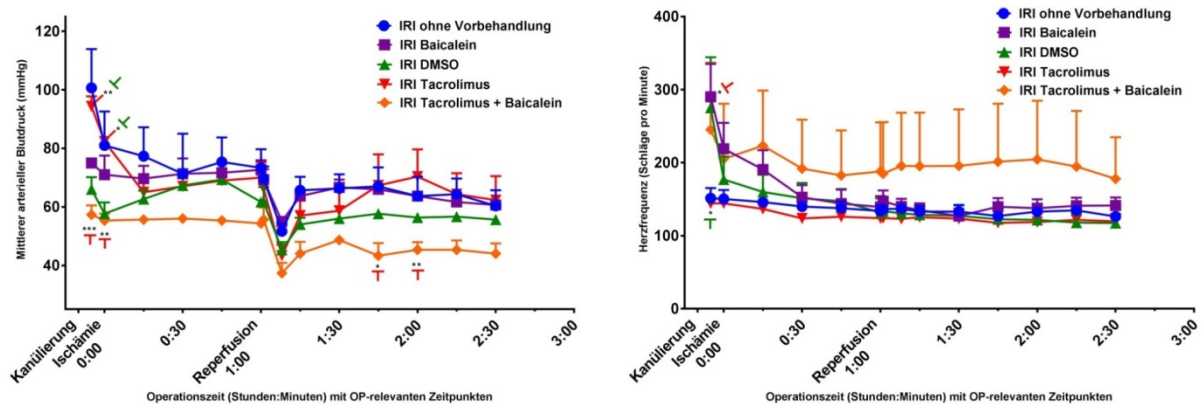


Abb. 95: Graphische Darstellung der Blutdruckkurven (links), sowie der Pulskurven (rechts) der Versuchsgruppen mit IRI-Induktion ohne Vorbehandlung (blaue Kurve, IRI ohne Vorbehandlung), mit Baicalein- (violette Kurve, IRI Baicalein), DMSO- (grüne Kurve, IRI DMSO), Tacrolimus- (rote Kurve, IRI Tacrolimus) und kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (orange Kurve, IRI Tacrolimus + Baicalein) im Verlauf des Experiments. Statistik (Šidák-Test): *** entspricht einem p-Wert < 0,001; ** entspricht einem p-Wert < 0,01; * entspricht einem p-Wert < 0,05. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den mit T farblich markierten Kurven zum jeweiligen Zeitpunkt. Signifikante Unterschiede zu IRI ohne Vorbehandlung sind in den Vorkapiteln behandelt worden und wurden nicht erneut angegeben. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Abgesehen von den Unterschieden zur unbehandelten IRI-Gruppe, die in den vorherigen Kapiteln bereits behandelt wurden, war zwischen den Therapiegruppen mit Induktion eines hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens bezüglich der Pulskurvenverläufe größtenteils kein signifikanter Unterschied festzustellen (Abb. 95). Die Herzfrequenzen nahmen in jeder Versuchsgruppe während des Experimentzeitraumes ab. Die Differenzen in der Pulsabnahme der verschiedenen Gruppen ist vor allen Dingen durch den unterschiedlichen Initialpuls bei Kanülierung zu erklären, welcher in der Baicalein-Gruppe ($p = 0,042$) wie auch in der DMSO-Gruppe ($p = 0,048$) signifikant schneller war als in der Tacrolimus-Gruppe. Im weiteren Verlauf erreichte die Pulscurve der IRI-Gruppe nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung die höchsten Werte. Ein signifikanter Unterschied konnte hierbei jedoch aufgrund der in 4.5.1 beschriebenen interindividuellen Pulsvarianz der Gruppe nicht dargestellt werden.

4.6.2 Zelltod

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass alle eingesetzten Therapiegruppen zu einer relevanten Zelltodreduktion nach Induktion eines hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden im Vergleich zur unbehandelten IRI-Gruppe führen (Abb. 96). Während der Unterschied zwischen der unbehandelten und der DMSO-Gruppe hierbei nur als negativer Regulationstrend ohne Signifikanz zu verzeichnen war, konnten die Differenzen zur nicht vorbehandelten Gruppe für die Baicalein- ($p < 0,001$), die Tacrolimus- ($p = 0,0015$) und die kombinierte

Tacrolimus- und Baicalein-Gruppe mittels t-Test als statistisch signifikant errechnet werden. Die Therapiegruppen wurden weiterhin untereinander verglichen. Hierbei konnte eine signifikante Zelltodabnahme um relativ 54,1% nach Baicalein-Gabe im Vergleich zur Vorbehandlung mit DMSO errechnet werden. Die weiteren Therapiegruppen zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede.

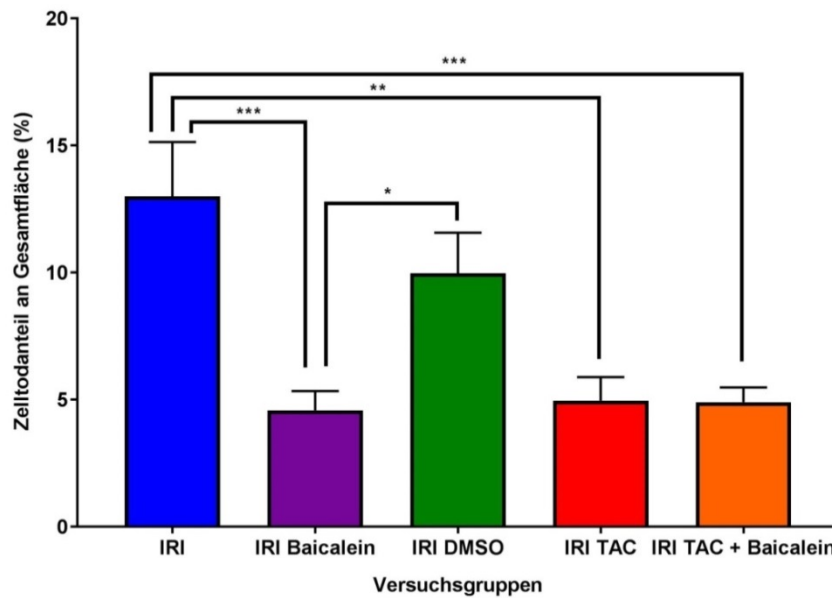


Abb. 96: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Zelltodanalyse im explantierten Lebergewebe mittels TUNEL-Assay in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI), nach Baicalein- (violetter Balken, IRI Baicalein), DMSO- (grüner Balken, IRI DMSO), Tacrolimus- (roter Balken, IRI TAC), sowie nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (oranger Balken, IRI TAC + Baicalein). Statistik (ANOVA, Tukey-Test): *** entspricht einem p-Wert von < 0,001; ** entspricht einem p-Wert von < 0,01; * entspricht einem p-Wert von < 0,05. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

4.6.3 Proapoptotische Enzyme

4.6.3.1 ERK1/2

Wie zuvor beschrieben, konnten in allen eingesetzten Therapiegruppen verglichen mit den unbehandelten postischämischen Lebern negative Regulationstrends in Bezug auf den Aktivitätsquotienten der ERK1/2 nachgewiesen werden (Abb. 97). Diese Abnahmen im Mittelwert nach entsprechender Vorbehandlung waren jedoch in keinem der eingesetzten Therapieverfahren signifikant. Die deutlichste Mittelwertreduktion des Aktivitätsquotienten von ERK1/2 zeigte hierbei die Baicalein-Vorbehandlung.

Auch der Gruppenvergleich konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen den eingesetzten Therapiegruppen ergeben. Es zeigte sich jedoch ein deutlicher negativer Regulations-

trend der ERK1/2-Aktivität nach Baicalein-Applikation im Vergleich zur DMSO-Vorbehandlung, während dieser in den anderen beiden Gruppen deutlich schwächer ausfiel.

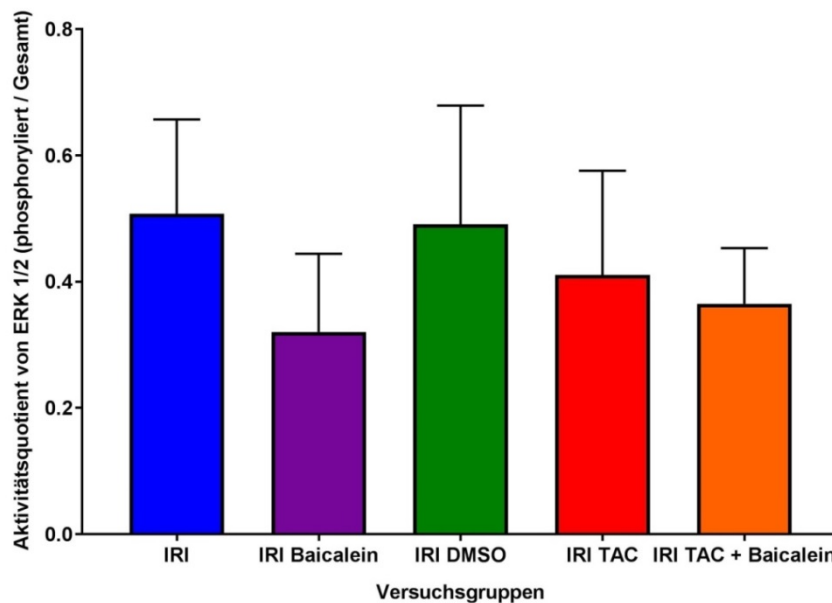


Abb. 97: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter ERK1/2 und Gesamt-ERK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI), nach Baicalein- (violetter Balken, IRI Baicalein), nach DMSO- (grüner Balken, IRI DMSO), nach Tacrolimus- (roter Balken, IRI TAC), sowie nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (oranger Balken, IRI TAC + Baicalein). Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

4.6.3.2 SAPK/JNK

Vergleichbar mit den Ergebnissen der ERK1/2-Auswertungen konnte im Rahmen der Evaluation des SAPK/JNK-Aktivitätsquotienten im postischämisch geschädigten Lebergewebe ebenfalls eine Aktivitätsabnahme in sämtlichen Therapiegruppen im Vergleich zur unbehandelten Versuchsgruppe festgestellt werden (Abb. 98). Allerdings erreichten im Gegensatz zu den zuvor gezeigten Ergebnissen der ERK1/2-Aktivität die Therapiegruppen, welche mit Baicalein, DMSO und Tacrolimus vorbehandelt wurden, deutliche Aktivitätsreduktionen der SAPK/JNK von statistischer Signifikanz, in der kombiniert behandelten Gruppe nur ein negativer, aber deutlicher Regulationstrend.

In der Auswertung der Therapiegruppen untereinander fielen erneut Differenzen unterschiedlichen Ausmaßes auf, jedoch ohne statistische Signifikanz. So präsentierte sich die Gruppe mit kombinierter Vorbehandlung mit einer deutlich erhöhten Enzymaktivität von SAPK/JNK im Vergleich zu den Gruppen mit den alleinig verabreichten Substanzen. Die anderen Gruppen unterschieden sich statistisch nur irrelevelant.

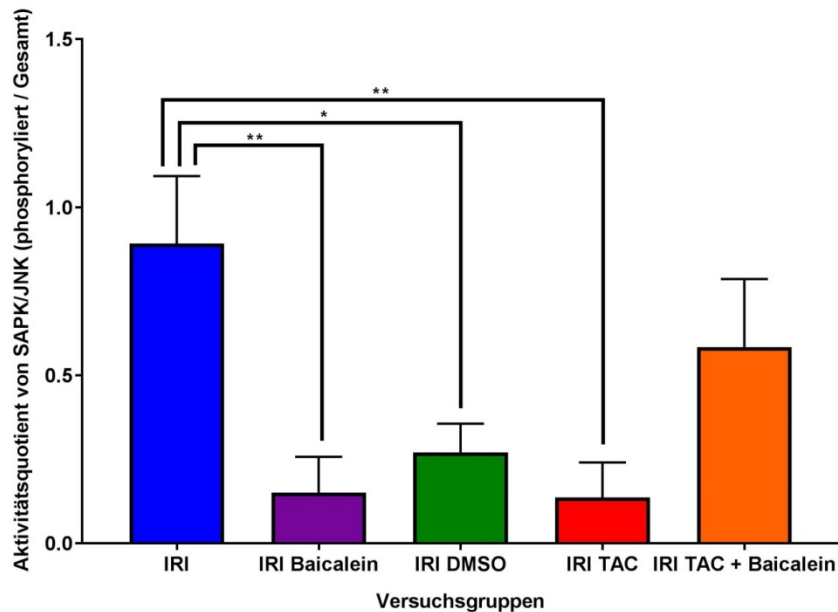


Abb. 98: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK und Gesamt-SAPK/JNK im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI), nach Baicalein- (violetter Balken, IRI Baicalein), nach DMSO- (grüner Balken, IRI DMSO), nach Tacrolimus- (roter Balken, IRI TAC), sowie nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (oranger Balken, IRI TAC + Baicalein). Statistik (ANOVA, Tukey-Test): ** entspricht einem p-Wert von $< 0,01$; * entspricht einem p-Wert von $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

4.6.3.3 Caspase-3

Die Analyse der verschiedenen Vorbehandlungsmethoden und deren Vergleich mit der unbehandelten Gruppe in Bezug auf die Aktivität der Caspase-3 nach Ischämie und Reperfusion ergab ein divergierendes Ergebnis. Die Aktivität der Caspase-3 konnte nämlich nach DMSO-Vorbehandlung im Vergleich zu den unbehandelten Versuchstieren im Lebergewebe gesteigert nachgewiesen werden (Abb. 99). In den restlichen Versuchsgruppen konnte eine hochsignifikante Enzymaktivitätsreduktion der Caspase-3 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt werden.

Somit ergab die Differenzierung der Therapieeffekte signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Therapiegruppen, vor allem im Bezug auf DMSO. Im Vergleich zu den Lebern der mit DMSO vorbehandelten Tiere wies das untersuchte Gewebe in der Baicalein-Gruppe einen signifikant reduzierten Caspase-3-Aktivitätsquotienten auf, wie auch nach Tacrolimus-Behandlung und kombinierter Vorbehandlung (jeweils $p < 0,001$). Zwischen den drei medikamentösen Versuchsgruppen, die eine signifikant verringerte Caspase-3-Aktivität im postischämischen Lebergewebe aufwiesen als die DMSO-Gruppe, konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

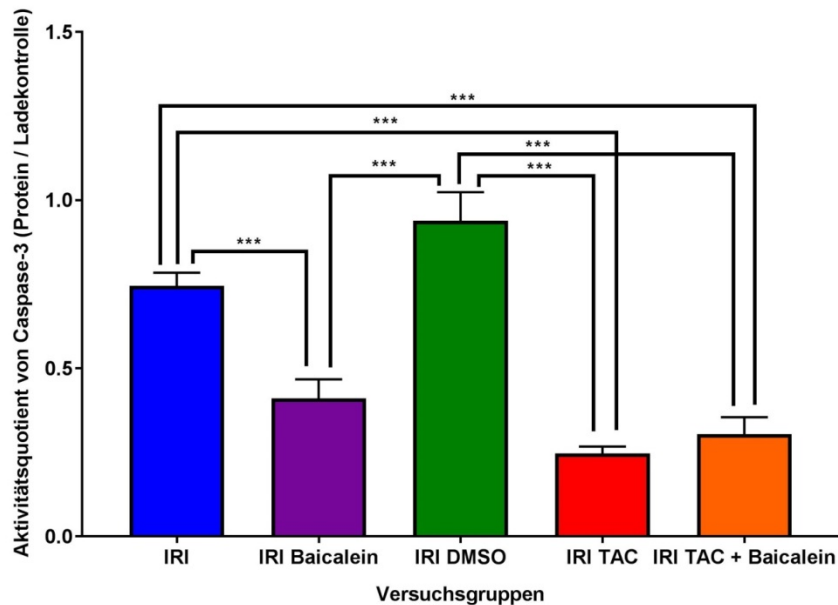


Abb. 99: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus Caspase-3 und deren Ladekontrolle GAPDH im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI), nach Baicalein- (violetter Balken, IRI Baicalein), nach DMSO- (grüner Balken, IRI DMSO), nach Tacrolimus- (roter Balken, IRI TAC), sowie nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (oranger Balken, IRI TAC + Baicalein). Statistik (ANOVA, Tukey-Test): *** entspricht einem p-Wert von < 0,001; ** entspricht einem p-Wert von < 0,01; * entspricht einem p-Wert von < 0,05. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

4.6.3.4 PARP

In der Analyse der PARP-Aktivität im postischämisch geschädigten Lebergewebe konnte festgestellt werden, dass jede untersuchte, medikamentöse Therapie zu einer Reduktion der PARP-Aktivität im Vergleich zur Gruppe der Tiere ohne Vorbehandlung führte (Abb. 100). Die alleinige Tacrolimus-Vorbehandlung war hierbei die einzige, die kein signifikantes Ergebnis erzielen konnte, wenngleich sie mit einem deutlich negativen Regulationstrend einherging. In den restlichen, medikamentösen Versuchsgruppen konnte eine signifikant gesenkte PARP-Aktivität gemessen werden.

In der Untersuchung der gruppenindividuellen Unterschiede der PARP-Aktivität konnte jedoch für keine der untersuchten Medikamentengruppen ein signifikanter Unterschied zu einer jeweils anderen Vorbehandlungsgruppe errechnet werden.

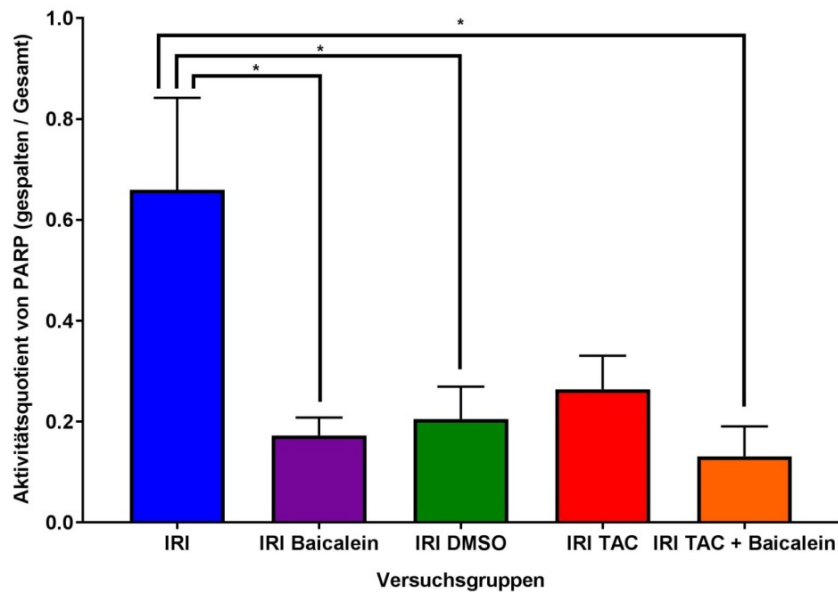


Abb. 100: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, gespaltenen PARP und Gesamt-PARP im explantierten Lebergewebe nach Proteinanalyse mittels Western Blot in den Versuchsgruppen nach Ischämie und Reperfusion im untersuchten Gewebe ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI), nach Baicalein- (violetter Balken, IRI Baicalein), nach DMSO- (grüner Balken, IRI DMSO), nach Tacrolimus- (roter Balken, IRI TAC), sowie nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (oranger Balken, IRI TAC + Baicalein). Statistik (ANOVA, Tukey-Test): * entspricht einem p-Wert von < 0,05. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

4.6.4 Alteration der Serum-Leberwertkonzentrationen

Relevante und signifikante Unterschiede in der Ausprägung der parameterspezifischen Steigerungsfaktoren waren als vorbehandlungskorrelierte, relative Blutwerterhöhungen nach Induktion eines Ischämie-Reperfusionsschadens im Vergleich zur Scheinoperation mit entsprechender Vorbehandlung vor allen Dingen bei der GOT, GPT und GLDH festzustellen (Abb. 101). Die Steigerungsfaktoren von Kreatinin und Bilirubin hingegen präsentierten sich in sämtlichen Gruppen ohne signifikante Differenzen. Während die Steigerungsfaktoren der Cholinesterase in der Baicalein- und der DMSO-Gruppe keine relevanten oder signifikanten Differenzen zur Ausprägung in der unbehandelten Gruppe zeigten, konnte jedoch eine signifikante Abnahme des Steigerungsfaktors der Cholinesterase in der Tacrolimusgruppe festgestellt werden. Dies lag vor allem daran, dass die ChE nach IRI-Induktion und Tacrolimus-Vorbehandlung im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe signifikant vermindert nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 77), während in sämtlichen anderen Versuchsgruppen hierbei keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren.

Im Gegensatz zur ChE-Auswertung präsentierten sich die Unterschiede der Steigerungsfaktoren in der Analyse der Transaminasen GOT und GPT, sowie der GLDH als relevant. So konn-

ten die Steigerungsfaktoren der GOT in jeder einzelnen, medikamentösen Versuchsgruppe, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe, in unterschiedlichem Ausmaße signifikant gesenkt werden. Auch die GPT-Volumenaktivitätserhöhung nach IRI-Induktion konnte, verglichen mit der unbehandelten Gruppe, in allen Therapiegruppen reduziert werden. Hierbei zeigten sich in der Baicalein- und der kombiniert vorbehandelten Versuchsgruppe lediglich insignifikante relative Steigerungsfaktoren, nach DMSO- und Tacrolimus-Applikation waren diese signifikant. Ein anderes Bild zeigte sich in der Tacrolimus-Gruppe nach Auswertung des GLDH-Steigerungsfaktors. Zwar war im Mittelwert erneut eine diskrete Abnahme der GLDH-Volumenaktivitätserhöhung festzustellen, diese jedoch ohne statistische Signifikanz. Im Gegensatz hierzu zeigten die relativen Abnahmen der GLDH-Steigerungsfaktoren nach Baicalein-Vorbehandlung, nach DMSO-Vorbehandlung, sowie nach kombinierter Tacrolimus-Baicalein-Behandlung hohe statistische Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

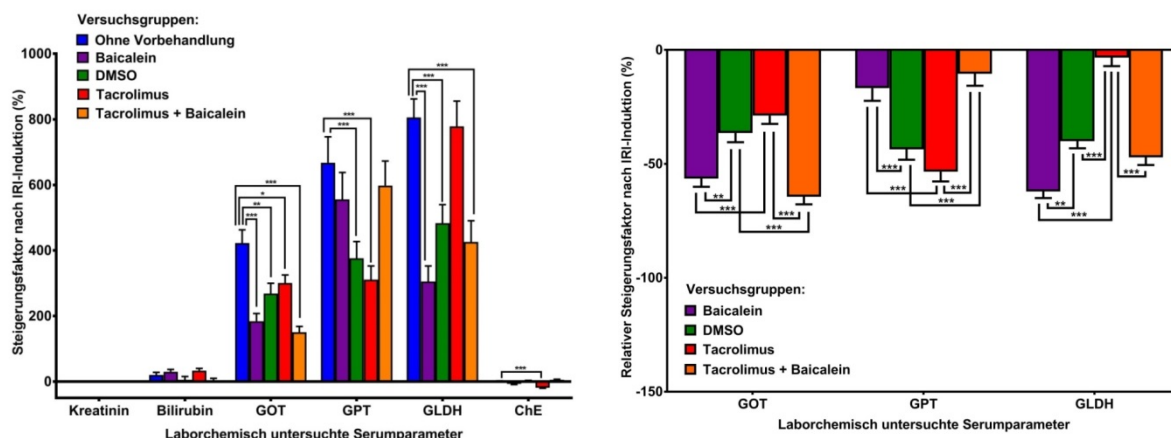


Abb. 101: Links: Graphische Darstellung der parameterspezifischen Steigerungsfaktoren der jeweiligen laborchemisch untersuchten Serumparame-ter nach IRI im Vergleich zur Scheinoperation, jeweils ohne Vorbehandlung (blauer Balken, ohne Vorbehandlung), nach Baicalein- (violetter Balken, Baicalein), nach DMSO- (grüner Balken, DMSO), nach Tacrolimus- (roter Balken, Tacrolimus), sowie nach kombinierter Vorbehandlung (oranger Balken, IRI Tacrolimus + Baicalein). Rechts: Graphische Darstellung der parameterspezifischen relativen Steigerungsfaktoren nach IRI-Induktion der jeweiligen laborchemisch untersuchten Serumparame-ter als relativer Unterschied der jeweiligen Steigerungsfaktoren, errechnet als relative Differenz zwischen Baicalein- (violetter Balken, Baicalein), DMSO- (grüner Balken, DMSO), Tacrolimus- (roter Balken, Tacrolimus) oder kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (oranger Balken) und keiner Vorbehandlung, jeweils nach IRI im Vergleich zur Scheinoperation. Statistik (ANOVA, Šidák-Test; t-Test): * entspricht einem p-Wert < 0,05; ** entspricht einem p-Wert < 0,01; *** entspricht einem p-Wert < 0,001. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

Der statistische Vergleich der einzelnen medikamentösen Therapiegruppen untereinander in Bezug auf die jeweiligen relativen Steigerungsfaktoren (Abb. 101) erbrachte, dass die GOT-, GPT- und GLDH-Erhö- hung in signifikant unterschiedlichem Ausmaße durch die entsprechenden Vortherapien reduziert werden können. So konnte die GOT-Erhö- hung durch die alleinige

Baicalein-Vorbehandlung, wie auch nach kombinierter Therapie signifikant stärker reduziert werden als nach DMSO oder alleiniger Tacrolimus-Therapie. Die beiden erstgenannten Therapiegruppen zeigten hierbei ebenfalls keine signifikante Differenz untereinander, wie auch die beiden letztgenannten. Ein ähnliches Ergebnis präsentierte sich nach Auswertung der relativen Steigerungsfaktoren für die GLDH, wenngleich die therapiespezifische Abnahme der Leberwertsteigerung nach Baicalein-Therapie am stärksten und somit signifikant stärker als nach Tacrolimus- und DMSO-Therapie ausfiel, welche jedoch selbst noch signifikant weniger relative GLDH-Ausschüttung zur Folge hatte als die Tacrolimus-Gruppe. Ein ähnlich signifikantes Ergebnis in Bezug auf die Tacrolimus-Gruppe und die relative GLDH-Freisetzung zeigte die kombinierte Vorbehandlung. Sämtliche anderen relativen Steigerungsfaktoren der GLDH unterschieden sich nicht signifikant untereinander. Die Auswertung der GPT-spezifischen relativen Steigerungsfaktoren zeigte hierbei nun ein anderes Ergebnis als nach Auswertung von GOT und GLDH. Hier präsentierte sich die relative Abnahme der GPT-Erhöhung nach Tacrolimus-Therapie, sowie nach DMSO-Vorbehandlung am negativsten und damit jeweils signifikant stärker als nach alleiniger Baicalein-Vorbehandlung oder kombinierter Therapie. Hierbei unterschieden sich weder die beiden negativeren relativen Steigerungsfaktoren der DMSO- und Tacrolimus-Gruppe signifikant voneinander, noch die beiden schwächeren Reduktionsfaktoren der Baicalein- und Kombinationsgruppe.

Somit konnte dargestellt werden, dass die alleinige Baicalein-Vorbehandlung, sowie die kombinierte Baicalein-Tacrolimus-Vorbehandlung vor allen Dingen über eine signifikante Reduktion der Volumenaktivitätserhöhung von GOT und GLDH fungieren, während die alleinige Tacrolimus-Therapie vor allen Dingen zu einer stärkeren Abnahme der GPT-Steigerung führt. Die alleinige DMSO-Behandlung führt hierbei zu einer gleichmäßigen Reduktion der Steigerungsfaktoren aller untersuchten Leberzellschädigungsparameter, wobei diese für GOT und GLDH signifikant schwächer ausfällt als nach Baicalein-Behandlung, sowie für GPT signifikant stärker ausfällt.

4.6.5 Substratverbrauch von Gpx4

Die Analysen der Effekte auf den Glutathionmetabolismus zeigten, dass die Vorbehandlungen mit Baicalein, Tacrolimus, sowie der kombinierten Gabe beider Medikamente zu einer signifikanten gesteigerten Glutathionoxidierung im Vergleich zur medikamentös unbehandelten Kontrollgruppe führten (Abb. 102). Die alleinige DMSO-Applikation präsentierte

ebenfalls einen positiven Regulationstrend, jedoch erzielte dieses Ergebnis keine statistische Signifikanz.

Um potentielle Therapiesuperioritäten aufzeigen zu können, erfolgte ein Gruppenvergleich. Hierbei konnte zwischen den verschiedenen verwendeten Therapeutika allerdings kein signifikanter Unterschied verzeichnet werden. Die Tacrolimus-Therapie ging hierbei zwar mit der stärksten Zunahme an Oxidierungsaktivität einher und somit auch im Trend etwas stärker als die Baicalein-Gruppe ($p = 0,2732$) und deutlich stärker als die schwächste Gruppe nach DMSO-Behandlung ($p = 0,0781$). Jedoch waren diese Unterschiede statistisch, wenn teilweise auch nur knapp, nicht signifikant.

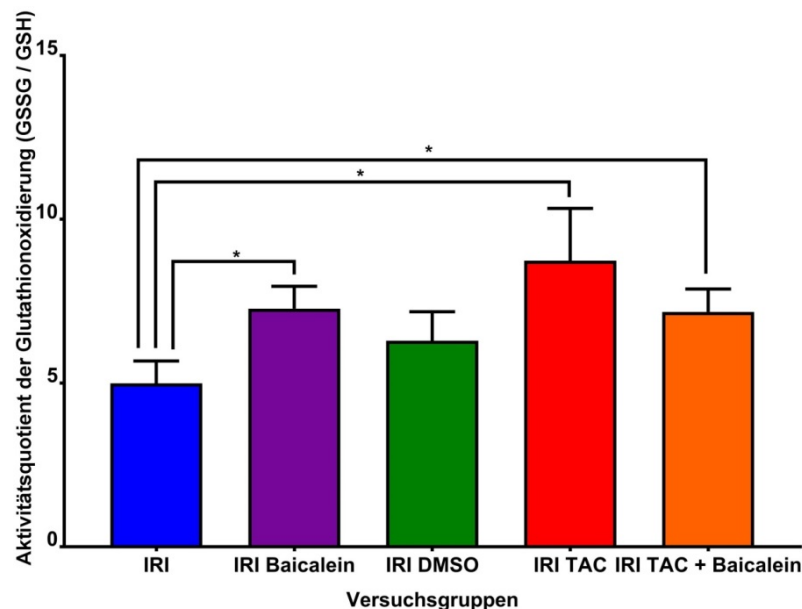


Abb. 102: Graphische Darstellung des Aktivitätsquotienten der Glutathionoxidierung aus oxidiertem Glutathion-Disulfid (GSSG) und reduziertem Glutathion (GSH) im explantierten Lebergewebe nach spektralphotometrischer Auswertung und Induktion eines hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens ohne Vorbehandlung (blauer Balken, IRI), nach Baicalein- (violetter Balken, IRI Baicalein), nach DMSO- (grüner Balken, IRI DMSO), nach Tacrolimus- (roter Balken, IRI TAC), sowie nach kombinierter Tacrolimus- und Baicalein-Vorbehandlung (oranger Balken, IRI TAC + Baicalein). Statistik (ANOVA, Tukey-Test; t-Test): * entspricht einem p-Wert von $< 0,05$. Signifikanzhinweise beziehen sich auf Unterschiede zwischen den markierten Balken. Der Standardfehler des Mittelwerts ist angegeben.

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Fragestellung

In Zeiten, in denen der Organmangel sich weiter verschärft, zunehmend marginale Organe zur Transplantation akzeptiert werden müssen und die Prognose von Patienten, die sich auf der Warteliste zur Lebertransplantation befinden, zusehends abnimmt, ist es Aufgabe der Forschung, Möglichkeiten zu evaluieren, wie man die wenigen, zu Verfügung stehenden Organe besser schützen kann. Hierbei ist der Gedanke, bereits bei der Entstehung des Ischämie-Reperfusionsschadens (IRI) anzusetzen, einleuchtend, da er eine unvermeidliche Hauptkomplikation der Lebertransplantation, wie auch der ausgedehnten Leberresektion, darstellt (20, 21, 24). Der IRI betrifft jedes zu transplantierende Organ, kann zu einer langfristigen Schädigung eines Lebertransplantats führen und unmittelbar das Organüberleben einschränken (17, 24). Natürlich ist dieser Forschungsansatz nicht neu, jedoch wurde lange Zeit die Kaltischämie als zentraler Initiator des IRI betrachtet, was schlussendlich in der Entwicklung neuer Organperfusionslösungen und logistischer Infrastrukturen innerhalb des Eurotransplant-Netzwerks mündete (19, 297-299). Hierdurch konnten Kaltischämiezeiten verringert, die Organqualität verbessert und das Transplantatüberleben verlängert werden (6, 297). Mit der Entdeckung, dass Warmischämie zu unterschiedlichen Gewebsschädigungen führt als Kaltischämie, allen voran zu Untergang von parenchymalen Leberzellen und Schädigung der Gallenwege, hat sich der Fokus der Forschung aufgrund der Diversität dieser Ischämieformen etwas verschoben (300-302).

Zahlreiche Forschungsgruppen konnten zeigen, dass mehrere Formen des Zelltods an der Entwicklung des hepatischen IRI teilnehmen, vor allem nach warmer Ischämie (30, 113, 116). Jede einzelne dieser Zelltodformen vermittelt organspezifische Schäden auf verschiedene Weise, weshalb das Wissen hierüber für eine gezielte Therapie von Relevanz ist. Weitläufig wird Apoptose nach wie vor als hauptsächliche Form des Zelltods im hepatischen IRI betrachtet, wenngleich mittlerweile bekannt ist, dass verschiedene Zelltodarten unter gewissen Vorraussetzungen ineinander übergehen können (30). Am Anfang steht hierbei stets die postischämische Entwicklung von ROS und großteils die MPT (303). Die Plasmamembranruptur nach Zellschwellung bei Nekrose führt zum Ausstrom intrazellulärer Bestandteile wie Zytokine, Alarmine und sogenannter DAMPs, die wiederum selbst körpereigene Immunzel-

len aktivieren und zu einer Entzündungsreaktion im Gewebe führen (304). Dies wird als wahrscheinlicher Grund für die Korrelation von IRI und Abstoßungsreaktionen nach Lebertransplantation erachtet (305). Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren weitere Zelltodmechanismen, allen voran die Ferroptose, nach oxidativem Stress auf zellulärer Ebene beschrieben (110, 113). Deren Rolle im hepatischen IRI konnte in vivo bisher jedoch noch nicht ausreichend dargestellt werden. Jedoch scheint sie in eindeutigem Zusammenhang mit überschießender Membranlipidperoxidation zu stehen und somit mit der Gpx4-abhängigen Signalkaskade (114, 115). Diese konnte im IRI extrahepatischer Organsysteme bereits als relevant nachgewiesen werden (119, 145). Zuvor konnte auch das etablierte und viel verwendete Immunsuppressivum Tacrolimus mit hepatoprotektiven Effekten und Einfluss auf den Glutathionmetabolismus assoziiert werden (216). Daher scheint die Darstellung der Rolle des Glutathionmetabolismus durch Hemmung der 12/15-LOX, einem zur Gpx4 antagonistisch wirkenden Enzym, und Tacrolimus-Applikation ein sinnvoller Ansatz zu einem besseren Verständnis des hepatischen IRI nach warmer Ischämie zu sein. Eine umfassende Analyse verschiedener Zelltodmediatoren wie bekannter proapoptotischer Proteine stellt hierbei ein probates Mittel dar, um neue Erkenntnisse zur Differenzierung der Zelltodformen und Signalkaskaden zu gewinnen, die zum aktuellen Zeitpunkt nicht vollumfassend verstanden sind.

Um die Auswirkungen von Baicalein, einem 12/15-LOX-Hemmer, und Tacrolimus auf den Organismus und spezifisch auf den hepatischen IRI möglichst realitätsnah zu untersuchen, wurde sich für ein in-vivo-Experiment und somit für ein Mausmodell mit Induktion warmer Leberischämie entschieden.

5.2 Diskussion von Material und Methoden

5.2.1 Diskussion des Modells

In der hier dargestellten Versuchsreihe wurde die warme Ischämie in den IRI-Versuchsgruppen durch das Abklemmen des gemeinsamen Pedikels von RAS, LAS und LPS induziert. Entsprechend der Methodenpublikation von Hori et al. aus dem Jahre 2011 entspricht dies einem der Ischämie zugeführten Leberanteil von ca. 65%, weshalb in der Literatur bei dieser Art von Operation von 2/3-Ischämie, beziehungsweise 2/3-Hepatektomie bei Resektionsexperimenten die Rede ist (240, 243). Es wurde sich für diese Art von Operation entschieden, weil der gemeinsame Leberlappenpedikel operativ gut darzustellen ist und somit eine sichere, wie auch reproduzierbare Ischämie durchzuführen ist. Darüber hinaus bietet diese

Form der Operation den großen Vorteil, einerseits ausreichend Lebergewebe für nachfolgende Untersuchungen und systemisch messbare Effekte auf Kreislauf und Laborparameter zur Verfügung zu haben. Andererseits konnte in der Literatur beschrieben werden, dass eine 2/3-Ischämie oder –Hepatektomie vom Großteil der Versuchstiere gut kompensiert werden kann, während darüber hinaus gehende Resektionen oder Ischämieoperationen zu einem massiven, systemisch wirksamen Leberversagen führen, wodurch das Risiko von Verfälschungen, Versuchsabbruch und Versuchstiersterben deutlich erhöht wird (240-243). Somit handelt es sich bei der hier durchgeführten Operation um ein etabliertes und sicheres Verfahren mit validen und reproduzierbaren Ergebnissen.

Ebenfalls etabliert ist die durchgeführte opiodbasierte Narkose unter intraarterieller Kreislaufüberwachung, die für das Monitoring der Narkosetiefe eminent wichtig ist (238, 239). Die hierfür notwendige Kanülierung von ACC wurde ebenso in mehreren Publikationen als sicher durchführbar beschrieben, ohne dabei Hinweise auf eine Verfälschung des Restexperiments zu bieten (306). Eine für diese Form der Narkose typische Hypothermie wurde durch die Anwendung einer Wärmeplatte verhindert (239). Die Probenasservation wurde mit der Exsanguinierung begonnen, um ausreichend Volumen an Vollblut für die späteren Serumanalysen gewinnen zu können. Dies ist insofern wichtig, da es bei einer vorgezogenen Explantation der entsprechenden Leberlappen vor der Blutentnahme einerseits zu größeren Blutungen kommen kann, wodurch eine adäquate venöse Blutentnahme unmöglich wird, andererseits hierdurch massiv Leberzellparameter in das Blut ausgeschüttet werden könnten. Dies hätte fehlerhafte Werte in der Serumanalyse zur Folge. Kritisch muss jedoch angemerkt werden, dass durch die angewandte Reihenfolge Minderperfusionseffekte in den konsekutiv entnommenen Leberlappen auftreten können. Dieser Effekt ist aus Autorensicht im Vergleich zu den potentiellen Auswirkungen einer umgekehrten Reihenfolge jedoch deutlich zu vernachlässigen.

Die zu verabreichenden Medikamente wurden intraperitoneal appliziert, was eine praktikable und relativ sichere Applikationsmethode für Medikamente bei Versuchstieren darstellt (307-310). Das Risiko der intraluminalen Präparatapplikation in ein Hohlorgan wurde durch Kontrolle des Darmdurchmessers überprüft (309). Die peritoneale Resorption von Medikamenten benötigt üblicherweise die doppelte bis dreifache Zeitspanne wie jene von intravenös verabreichten Präparaten (310). Daher wurde eine mindestens 30-minütige Peri-

ode zwischen Medikamentengabe und Laparotomie abgewartet. Die Tacrolimusgabe erfolgte sogar bereits 24 Stunden vor Laparotomie, da verschiedene Studien nachweisen konnten, dass sich die Tacrolimus-Serumkonzentration in Tierexperimenten nach intraperitonealer Applikation nach dieser Zeit in den entsprechend der verabreichten Dosis therapeutischen Bereichen befindet (311, 312).

Diverse Modelle zu IRI-Versuchen sind bekannt, bei denen jeweils unterschiedliche Längen der Ischämie- und Reperfusionsphasen angewendet werden (313, 314). In dem hier dargestellten Forschungsprojekt wurde eine Ischämiezeit von 60 Minuten, sowie eine verhältnismäßig kurze Reperfusionsphase von 90 Minuten etabliert, bevor das Gewebe der Untersuchung zugeführt wurde. Kritisch könnte man anmerken, dass mit längerer Ischämie und längerer Reperfusion gegebenenfalls deutlichere Ergebnisse erzielt werden hätten können, da das Ausmaß des hepatischen IRI mit der Dauer der Ischämie korreliert (27, 28). Bewusst wurde die Länge von Ischämie und Reperfusion jedoch relativ kurz, aber noch ausreichend zur Entwicklung eines manifesten IRI gewählt, da mit längerer Ischämie deutlich geringere Überlebensraten der Versuchstiere beschrieben sind, aber auch bei längerer Reperfusion bereits endogene Reparaturmechanismen beginnen, die eigentlichen Therapieeffekte zu kaschieren (313, 314).

Die Sham-Operation beinhaltete nicht nur das Öffnen der Peritonealhöhle, wie es in anderen Experimenten üblich wäre. Bewusst wurden ebenfalls die ligamentären, der Leber adhären-ten Strukturen gelöst und somit - wie in der Versuchsgruppe der IRI-Induktion - der Pedikel von RAS, LAS und LPS freigelegt. Diese präparatorischen Schritte schlugen sich in der Serum-analyse der Parameter der Leberzellschädigung wieder. Nach Scheinoperation konnten Serumwerte der GOT von $152,0 \pm 34,3$ U/l, sowie der GPT von $121,0 \pm 26,5$ U/l gemessen werden, wobei der murine Normwert für die GOT bei 40-60 U/l und für die GPT bei 24-40 U/l liegt (315). Die Präparation schien somit zu einem alleinigen Transaminasenanstieg als Ausdruck der Leberzellschädigung bei hepatischer Präparation geführt haben. Die somit gewonnen Laborparameter wurden zur weiteren Berechnung als Basiswert für konsekutive Vergleiche verwendet. Hierdurch sollte verhindert werden, dass allein durch die Präparation angefallene Transaminasenerhöhungen als Therapieeffekte fehlgedeutet werden können.

5.2.2 Diskussion der Analyseverfahren

Die systemischen Kreislaufparameter während eines operativen Experimentes zu erfassen, zählt zu den relevantesten Grundvoraussetzungen, um reproduzierbare und valide Ergebnisse zu erhalten. Nur so kann sichergestellt werden, dass beobachtete Therapieeffekte tatsächlich mit einer applizierten Therapie vergesellschaftet sind und nicht durch Kreislaufinsuffizienzen, die beispielsweise durch eine inadäquat vollzogene Anästhesie entstanden sind. Dies wurde in diesem Fall invasiv durch ein intraarterielles Blutdruck- und Herzfrequenzmonitoring mit Elektromanometer durchgeführt, welches von der Funktionsweise der Kreislaufüberwachung eines menschlichen Patienten während einer Operation entspricht und somit ein etabliertes Verfahren darstellt. Auch das in diesem Versuch verwendete System konnte bereits in vorherigen Tierversuchen valide Ergebnisse liefern (238, 316). Mit Blick auf die aktuelle Literatur könnte man kritisch anmerken, dass mittlerweile auch in Tierversuchen nicht-invasive Methoden der Kreislaufüberwachung zunehmend eingesetzt werden, welche naturgemäß ein deutlich niedrigeres Trauma verursachen (238, 317, 318). Jedoch wurde sich bewusst für die intraarterielle Messmethode entschieden, da somit einerseits kontinuierliche und exaktere Ergebnisse zu erzielen sind, sowie andererseits durch den geplant letalen Ausgang des Experiments die Auswirkungen einer Vergrößerung des Operationssitus für einen etwaigen postoperativen Verlauf zu vernachlässigen waren (306, 319).

Die Auswertung des Zelltods war für die Fragestellung dieses Experiments elementar. Zur Messung des Zelltods, vor allem jenes der durch Apoptose verursacht wird, stehen diverse Verfahren zu Verfügung, die von der rein histologischen Beurteilung, über Caspase- und Cytochrom-Messung, bis zur Auswertung der mitochondrialen Depolarisation und supravitalen Zellkernfärbung reichen (30). Der Zelltod wurde im hier beschriebenen Experiment mit Hilfe des TUNEL-Assays ausgewertet. Lange Zeit galt der TUNEL-Assay als spezifisches Messinstrument für apoptotische Zellen, da hierbei fragmentierte DNA gefärbt wird, was üblicherweise als Charakteristikum der Apoptose beschrieben wurde (248-252). Mittlerweile ist bekannt, dass ein TUNEL-Assay nicht zwischen freien DNA-Enden unterscheiden kann, die einerseits nach internukleosomaler Spaltung durch Apoptose entstanden sind, und solchen, welche in zerstörten, nekrotischen Zellkernen enthalten sind (30). Dieser TUNEL-positive Effekt in nekrotischen Zellen ist vor allem durch eine postnekrotische DNA-Hydrolyse und kalziumabhängige Aktivierung von Endonukleasen zu erklären (30, 320, 321). Der etablierte TUNEL-Assay wurde dennoch aufgrund seiner guten Anwend- und Reproduzierbarkeit be-

136

nutzt (253). Zudem war die Darstellung sämtlicher, abgestorbener Zellen erwünscht, da ein Einblick in die Apoptosedifferenzierung vor allen Dingen durch die Auswertung der verschiedenen proapoptotischen Proteine erfolgen sollte.

Ebenfalls etabliert ist das Verfahren, das zur Proteinanalyse im Gewebe angewandt wurde. Seit seiner Entwicklung im Jahre 1979 wurde das Western Blot-Verfahren stetig weiterentwickelt und standardisiert, so dass es derzeit das am häufigsten verwendete Verfahren zur Proteindetektion im Laborumfeld darstellt (259, 261). Die Vorteile sind hierbei vor allem in der einfachen Reproduzierbarkeit und dem kostengünstigen Preis zu sehen. In den vergangenen Jahren haben sich weitere Untersuchungen zur selektiven Proteinquantifizierung in verschiedenen Anwendungsfeldern etabliert. So ist die gezielte Massenspektrometrie zur Detektion spezifischer Proteine heute ebenso in Gebrauch wie Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktionen (rt-PCR) (322-324). Diese kostenintensiveren Verfahren, die teilweise sogar höhere Spezifitäten als der Western Blot aufweisen, benötigen üblicherweise jedoch deutlich größere Mengen an zu untersuchendem Material, weshalb sie üblicherweise häufiger bei menschlichen Blutuntersuchungen zum Einsatz kommen (322-324). Aufgrund der geringen Menge an zu untersuchendem, murinem Lebergewebe, wurde sich daher für den etablierten Western Blot mit vielfach erprobten Antikörpern entschieden.

Die im Rahmen dieser Versuchsreihen verwendeten laborchemischen Verfahren zur Serumanalysen wurden durch das Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München betreut. Da das Institut für Laboratoriumsmedizin tagtägliche Erfahrung mit der Analyse von humanen Produkten in klinischer Umgebung hat, konnte ein hoher Qualitätsstandard gewährleistet werden. Hierzu trug ebenso bei, dass die angewandten, photometrischen Verfahren der Mausserumanalyse exakt jenen entsprachen, die in ähnlicher Fragestellung beim Menschen angewendet werden und auf vergleichbaren Referenzgeräten durchgeführt wurden, welche in regelmäßigen Abständen nach gründlichen Kontrollen unabhängiger Prüfinstitute zertifiziert werden. Somit entsprachen die Serumanalysen einem äußerst etablierten, hochqualitativen Verfahren.

Der im Rahmen der hier beschriebenen Versuchsreihen angewandte Testaufbau zur Darstellung der Glutathionkonzentrationen beruht auf den kinetisch-spektralphotometrischen Nachweisverfahren, die von Tietze 1969 erstbeschrieben und im weiteren Verlauf von Lauterburg 1984 modifiziert und optimiert wurden (280, 283). Somit wurden Nachweisverfah-

ren angewandt, welche schon mehrere Jahrzehnte in regelmäßigem Einsatz im experimentellen Labor stehen und somit als etabliert und valide betrachtet werden können (325, 326). Mittlerweile werden auch alternative Verfahren zum Nachweis von Glutathionkonzentrationen angewandt, wie beispielsweise die Flüssig-Chromatographie, welche auf UV-Absorption beruht, oder auch massenspektrometrische Verfahren (325, 326). Der Vorteil der Glutathion-Messung mit Hilfe der Tietze-Methode ist eindeutig in der Sensitivität und einfachen Handhabung zu sehen, während die Vorteile der Alternativmethoden vor allem dahingehend zu betrachten sind, dass sie üblicherweise mit noch geringerer und unverdünnter Materialmenge zu bewerkstelligen sind (325, 326). Dennoch konnten bislang keine signifikanten Unterschiede in Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Nachweisverfahren von Glutathion dargestellt werden (325). Da die Tietze-Methode in dem Labor, in welchem die Versuche durchgeführt wurden, primär eingesetzt wird und somit am meisten Erfahrung hiermit bestand, wurde sich für den Einsatz dieses Verfahrens entschieden.

5.2.3 Diskussion der Auswertungsverfahren

Das verwendete Statistikprogramm „GraphPad Prism 7 for Windows“ (Version 7.02) stellt ein mittlerweile vielfach verwendetes und im wissenschaftlichen Umfeld etabliertes Statistik- und Grafikprogramm dar. Mehrere internationale Studien haben bislang dieses Programm zur statistischen Auswertung ihrer Ergebnisse verwendet. So erbrachte eine Suche zu dem Suchbegriff „GraphPad Prism“ auf der international etablierten Suchplattform „PubMed“ für medizinische Veröffentlichungen 408 Artikel, welche diese Begriffe sogar in ihren Schlagwörtern angebracht hatten (Stand: November 2018). Somit ist davon auszugehen, dass die Anzahl an Studien, die effektiv mit diesem Programm gearbeitet haben, um ein Vielfaches höher liegt. Darüber hinaus stellen die mit Hilfe dieses Programms angewendeten statistischen Testverfahren und Post-Hoc-Tests ebenfalls weit etablierte Verfahren für die entsprechenden Fragestellungen dar (285-290, 327).

Ferner erfolgte die Auswertung der fluoreszenzgefärbten, toten Zellen des Lebergewebes nach Anwendung des TUNEL-Assays mit Hilfe der halbautomatisierten, optischen Flächenfraktionsanalyse. Klassische Methoden der Auswertung eines TUNEL-Assays sehen üblicherweise vor, die TUNEL-positiven Zellen per Hand zu zählen und im Weiteren diese Zellzahl miteinander zu vergleichen. Nicht nur stellt dieses Verfahren bei ungefähr 100 angefertigten Bildausschnitten pro Versuchsgruppe eine mühselige Arbeitsweise dar, sie präsentiert sich

auch anfällig für Auswertungsfehler. So können unmittelbar benachbarte Zellkerne, deren TUNEL-positive Fluoreszenzsignale sich überlagern, als ein Zellkern fehlgedeutet werden und somit zu falsch niedrigen Ergebnissen führen. Die optische Flächenfraktionsanalyse minimiert dieses Risiko und evaluiert das insgesamt anfallende Fluoreszenzsignal objektiv im Verhältnis zur Gesamtfläche. Kritisch kann angemerkt werden, dass durch die benutzerabhängige, manuelle Einstellung von Kontrast und Helligkeit eines Bildes Potential für subjektive Über- und Unterschätzung TUNEL-positiver Areale und somit Fehler besteht. Diese Gefahr wurde dadurch minimiert, dass die Auswertung der Bildausschnitte verblindet erfolgte, sowie durch den Einsatz von jeweils zwei Untersuchern pro Bildausschnitt. Der Mittelwert beider gewonnenen Ergebnisse wurde im Weiteren verarbeitet. Ähnliche Methodik wurde bereits in Referenzveröffentlichungen angewendet (328, 329). Auch die Auswertung von Western Blots mit Hilfe von „ImageJ“ stellt ein mehrfach angewendetes und etabliertes Verfahren dar (330).

Ein weiteres Verfahren zur Auswertung, welches mehrfach angewandt wurde, stellt die Spektralphotometrie dar. Die Bestimmung von Adsorptionsintensität und Extinktion von bestimmten Stoffen stellt ein absolutes Standardverfahren in der Analyse von Stoffkonzentrationen dar (294). Dieses Verfahren ist mittlerweile derart etabliert, dass der absolute Großteil dieser Auswertungen mittlerweile automatisiert vonstattengeht. Somit konnten untersucherabhängige Fehler auf ein Minimum reduziert werden, was spektralphotometrischen Untersuchungen einen äußerst reliablen Charakter verleiht.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Kreislaufstabilität und –unterschiede der Versuchsgruppen

Um die Untersuchungsergebnisse vergleichbar zu gestalten, musste darauf geachtet werden, dass die Kreislaufparameter der Versuchstiere kontinuierlich auf eventuelle Blutdruck- und Herzfrequenzschwankungen hin streng kontrolliert wurden. Längere hypotensive Episoden können nämlich einerseits das hepatische Untersuchungsergebnis relevant beeinflussen (306). Darüber hinaus können diese Schwankungen durchaus zur Interpretation von Auswirkungen verschiedener Medikamente und Interventionen herbei gezogen werden.

Da bei sämtlichen Versuchstieren die gleiche Operation in standardisierter Vorgehensweise mit derselben, gewichtsadaptierten Narkose durchgeführt wurde, wurden Unterschiede im

Rahmen des Kreislaufmonitorings am ehesten im Rahmen der jeweiligen medikamentösen Therapie gewertet, worauf in den entsprechenden Folgekapiteln nochmalig im Detail eingegangen wird. Großteilig wiesen sämtliche, untersuchte Versuchstiere der IRI-Gruppen einen vergleichbaren Verlauf Ihrer Blutdruck- und Pulskurven auf, wenngleich die Druckverhältnisse im Durchschnitt signifikant unterhalb jenen der scheinoperierten Gruppen lagen. Obwohl eine konsequente Flüssigkeitssubstitution über das offene Abdomen angewandt wurde, könnten diese Druckunterschiede auch durch die verlängerte Operationszeit und somit der prolongierten Öffnung des Abdomens in Einklang zu bringen sein. Was alle Gruppen gemein hatten, war ein Mitteldruckabfall unmittelbar anschließend an die Reperfusion, welcher sich zu einem Großteil selbstlimitierend präsentierte. Dieser Mitteldruckabfall ist dahingehend zu interpretieren, dass das durch die Pedikelklemmung verursachte vaskuläre Totraumvolumen von ca. 2/3 der Leber in dieser Zeit wieder mit Blut versorgt wurde, was eine relative Hypovolämie des restlichen Blutkreislaufs zur Folge hatte. In relativ kurzer Zeit gelang es dem kardiovaskulären Organismus des Versuchstieres wieder, über vasokonstriktive und positiv inotrope Prozesse den Mitteldruck zu einem gewissen Teil wieder auszubauen. Dieses Phänomen ist im Rahmen von operativen Prozessen, in denen Teile des Blutkreislaufs der Zufuhr oder des Abflusses durch den restlichen Blutkreislauf unterbunden und wieder zugeführt werden, bekannt und erwartbar (306, 331).

Relevante und teils auch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen waren vor allen Dingen zu Beginn des Experiments festzustellen, da sich hier die Versuchsgruppen, bei denen DMSO angewandt wurde, also jene mit DMSO-Monotherapie, Baicalein-Therapie und kombinierter Tacrolimus-Baicalein-Therapie, mit deutlich erniedrigten Mitteldruckwerten und gesteigerten Herzfrequenzwerten präsentierten als jene ohne DMSO-Gabe. Ebenso wie die Tatsache, dass die kombiniert mit Tacrolimus und Baicalein therapierte Versuchsgruppe im Verlauf des gesamten Experiments einen durchschnittlich niedrigeren Mitteldruckverlauf, sowie einen durchschnittlich erhöhte Herzfrequenz aufwiesen, sind diese Beobachtungen am ehesten auf eine potentielle Toxizität der jeweils verwendeten Substanzen zurückzuführen (vgl. 5.3.6, 5.3.7 & 5.3.8). Der gegebenenfalls zu vermutende Verdacht, dass die intraperitoneal verabreichten Substanzen eventuell abdominelle Kompartmentsyndrome ausgelöst haben könnten, welche sich in Bezug auf die Kreislaufparameter ähnlich präsentieren könnten, wurde durch die Anwendung von intraperitonealen Injektionsvolumina deutlich unterhalb des etablierten, maximalen Injektionsvolumens minimiert (310, 332).

Da sich auch die initialen Unterschiede schnell selbstständig limitierten, konnte der Großteil des operativen Ablaufs in allen Versuchsgruppen als kreislaufstabil beschrieben werden und somit in Einklang mit Normwerten für Mausexperimente aus der Literatur (306, 333). Daher ist nicht davon auszugehen, dass die Ergebnisse relevant von Kreislaufveränderungen verfälscht wurden.

5.3.2 Inhibition von 12/15-Lipoxygenase verhindert Zelltod nach hepatischem IRI

Die Daten dieser Versuchsreihe konnten zeigen, dass die Vorbehandlung mit Baicalein in einem murinen, hepatischen Ischämie-Reperfusionsmodell zu einer signifikanten Abnahme des Zelltods im Lebergewebe führt. Da Baicalein als potenter und spezifischer Inhibitor der 12/15-Lipoxygenase nachgewiesen werden konnte, können diese Daten nur dahingehend gedeutet werden, dass die Hemmung der 12/15-LOX zu deutlich verringertem Zelltod nach hepatischem IRI führt (169). In der weiteren Folge drängte sich nun die Frage nach dem Zelltodmodus auf. Wenngleich die hier dargestellten Daten keinen eindeutigen Nachweis eines spezifischen Zelltodmodus' erbringen, so scheint es doch eher unwahrscheinlich, dass ein Großteil des beobachteten Zelltods von unregulierter Nekrose eingenommen wird. Vorangegangene Arbeiten konnten nämlich in IRI-Modellen der Leber zeigen, dass Gewebsnekrose üblicherweise erst über drei Stunden nach Einsatz des nekrotischen Reizes nachzuweisen ist, was einer Zeitspanne entspricht, die in dieser Versuchsreihe nicht erreicht wurde (303). Daher ist primär davon auszugehen, dass andere Formen des Zelltods wie Apoptose, Nekroptose oder die erst kürzlich beschriebene Ferroptose zu den beobachteten zellulären Untergängen führen. Dass Ferroptose hierbei von Relevanz zu sein scheint, steht in Einklang mit den Ergebnissen, welche die Arbeitsgruppe um Xie im Jahre 2016 erhoben hat. Diese war in der Lage, einen abmildernden Effekt von Baicalein auf die Ferroptoseentwicklung in Pankreaskarzinomzellen nachzuweisen (179). Ferner konnte auf hepatozellulärer Ebene ebenfalls bereits beschrieben werden, dass Gpx4 degenerative Prozesse verlangsamen und teilweise verhindern kann (152).

In Einklang mit diesen Erkenntnissen lassen die hier erhobenen Daten daher den spekulativen Rückschluss zu, dass die Gpx4-abhängige Signalkaskade, in welcher 12/15-LOX das Schlüsselenzym zur Entwicklung des Zelltods darstellt, auch im hepatischen IRI eine relevante Rolle zu spielen scheint.

5.3.3 Relevante Rolle der Gpx4-abhängigen Signalkaskade nach hepatischem IRI

Der direkte Einfluss des Glutathionstoffwechsels auf oxidativen Stress und dessen Auswirkungen in Ischämie-Reperfusionsmodellen konnte in der Literatur bereits beschrieben werden (163). Dieser oxidative Stress gilt durch das vermehrte Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies, welche zum unmittelbaren Organschaden führen können, als Haupttriebfeder des IRI (116). Die hier gezeigten Daten konnten darlegen, dass das beobachtete, verminderte Ausmaß an Zelltod mit einer signifikanten Steigerung des Glutathionmetabolismus nach Baicalein-Therapie einherging. Diese postischämische Zunahme an Glutathionoxidierung nach Hemmung der 12/15-LOX dämpfte somit mutmaßlicherweise den IRI-bedingten Leberschaden signifikant ab. Daher ist davon auszugehen, dass die hepatoprotektiven Effekte der 12/15-LOX-Inhibition durch Baicalein am ehesten im Rahmen einer Abnahme des oxidativen Stresses und folglich einer deutlich reduzierten Ausbildung reaktiver Sauerstoffspezies zu werten sind, was mutmaßlich dem Einfluss der Glutathionperoxidasen, vor allem der Gpx4, zuzuschreiben ist.

Somit ist zusammenfassend festzustellen, dass die hier erhobenen Daten die zuvor beschriebenen Modelle der antagonistischen Wirkung von 12/15-LOX und Gpx4 innerhalb deren Signalkaskade deutlich bekräftigen (115, 141). Baicalein, dessen effektive, hemmende Wirkung auf die 12/15-LOX wissenschaftlich verbürgt ist, konnte nach entsprechender Verabreichung somit das Lebergewebe tatsächlich vor einem postischämischen Zelluntergang signifikant schützen, was am ehesten auf die Abschwächung des oxidativen Stresses zurückzuführen ist (169). Diese Abschwächung führt nach Interpretation der Ergebnisse zu einer zunehmenden Glutathionoxidierung, beziehungsweise wird durch diese unterstützt, was durch eine relative Zunahme des (Per-)Oxidationsprodukts GSSG im Vergleich zu dessen reduzierten Substrats GSH gemessen werden konnte. Die 12/15-LOX wird vor allem durch reaktive Sauerstoffspezies aktiviert, welche wiederum selbst durch die Aktivität der Gpx4 vermindert werden können, was ein reduziertes Peroxidmilieu zur Folge hat (141). Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass Baicalein nicht nur durch seine allgemein antioxidative Eigenschaften das Peroxidmilieu der Zelle reduziert, sondern auch einen spezifischen, aktivierenden Einfluss auf den oxidativen Glutathionmetabolismus besitzt und somit mutmaßlicherweise auf die Gpx4. Diese beiden Effekte tragen folglich maßgeblich zu einer Abnahme der 12/15-LOX-Aktivität bei, was in verbessertem Leberzellüberleben resultiert.

Die Gpx4-abhängige Signalkaskade wurde in Bezug auf ihre Relevanz in der Entwicklung des ferroptotischen Zelltods bereits in den vergangenen Jahren tiefgründig erforscht. Hierbei konnte auf zellulärer Ebene gezeigt werden, dass es vor allem Einflüsse dieser Kaskade sind, die eine Art Schalter zur Entwicklung der Ferroptose darstellen (111, 180, 334). Betrachtet man nun diese Daten gründlich und kombiniert sie mit den Beobachtungen des Wechselspiels aus oxidativem Stress, Gpx4 und 12/15-LOX, die 2008 von Seiler und Loscalzo veröffentlicht wurden, kann man auf fundierter Grundlage zu dem Schluss kommen, dass anhaltender oxidativer Stress zu einer eingeschränkten Funktion der Gpx4 und im Umkehrschluss zur deutlichen Aktivierung der 12/15-LOX führt (115, 141). Dies wiederum hat aufgrund der massiv gesteigerten Membranlipidperoxidation eine Steigerung des Peroxidmilieus innerhalb der Zelle zur Folge. Darüber hinaus weisen die in dieser Studie erhobenen Daten auf eine ausgesprochene Relevanz dieser Wechselwirkungen auch innerhalb des hepatischen IRI hin, so dass davon ausgegangen werden kann, dass ein Großteil des beobachteten Zelltods von Alternativmechanismen zur Nekrose verursacht wird, entsprechend der Datenlage der Literatur mutmaßlich auch durch Ferroptose. Jedoch konnten auch deutliche Alterationen von proapoptotischen Proteinen beobachtet werden, so dass ein Teil des Zelltods sicherlich auch der Apoptose zugeschrieben werden kann (vgl. 5.3.4).

Die durch die 12/15-LOX entstandene 12S/15S-HpETE konnte auf Zellebene als wichtiger Ausgangsmetabolit zur Zelltodinduktion und als zentrale Lipidperoxidquelle nach IRI in vitro nachgewiesen werden, was mutmaßlich auf die mitochondriale Lage des Metaboliten und den damit verbundenen direkten und über Hepoxiline indirekten Einfluss auf die MPT zurückzuführen ist (vgl. 1.2.4). Die mitochondriale Membranständigkeit dieser Metabolite lässt daher den Schluss zu, dass die protektive Wirkung der Glutathionoxidation primär durch Gpx4 verursacht wird, da diese die einzige Gpx ist, die membranständige Lipidhydroperoxide metabolisieren kann (115, 141, 158). Explizit bei der Untersuchung des hepatischen IRI ist hierbei zu erwähnen, dass die Gpx4 im Zell- und Tierversuch als entscheidend für das Überleben von Hepatozyten beschrieben werden konnte (152). Eine Abnahme an mitochondrial verursachter Apoptose wurde daher bereits der Gpx4 zugeschrieben (141). Am ehesten wird in diesem Rahmen davon ausgegangen, dass das durch Gpx4-vermittelte Substratoxidierung verminderte Auftreten von Lipidhydroperoxiden zu einer Abnahme der MPT und somit zu verminderter Cytochrom C-Ausschüttung führt (160, 335). Mitochondriales GSH, welches ungefähr 15% des gesamten GSH-Reservoirs des menschlichen Organismus ausmacht,

konnte bereits als relevantes Antioxidans für das Zellüberleben ausgemacht werden (149). Die nun erhobenen Daten deuten darauf hin, dass die zuvor gewonnenen Ergebnisse durchaus mit der Aktivierung der Gpx4-abhängigen Signalkaskade in Einklang zu bringen sind, da GSH als obligates Co-Substrat der Gpx4 fungiert. Explizit die mitochondriale Lage des GSH und die Relevanz der MPT für den hepatischen IRI (vgl. 1.2.4) lassen die Schlussfolgerung zu, dass der in dieser Arbeit nachgewiesene Glutathionmetabolismus zu einem beachtlichen Anteil auf mitochondrialer Ebene vonstattengeht.

5.3.4 Relevante zelltodvermittelnde Mediatoren in Gpx4-abhängiger Signalkaskade

Wenngleich die genannten TUNEL-Ergebnisse alleine betrachtet nicht den Anteil an Apoptose nachweisen können, ist aufgrund der deutlichen Alteration etablierter proapoptotischer Proteine davon auszugehen, dass ein signifikanter Anteil der toten Zellen auf Apoptose zurückzuführen ist. Vermutete man vor gut 10 Jahren noch den Apoptose-induzierenden Faktor AIF als zentrales, caspase-unabhängiges Effektormolekül des 12/15-LOX-assoziierten Zelltods, lassen die aktuell erhobenen Daten, sowie neuere Literaturdaten Raum für Diskussion zu (115). So konnte im Jahr 2008 durch die Arbeitsgruppe um Seiler in postischämischen Knockout-Zellen, in welchen die Genexpression von Gpx4 unterdrückt wurde, keine Caspase-3-Aktivierung nachgewiesen werden, weshalb die Hypothese zur AIF-Induktion durch 12S-HpETE, dem unmittelbaren Produkt der 12/15-LOX-Aktivierung, aufgestellt wurde (115, 141). Im Gegensatz hierzu konnten mehrere vorangegangene Publikationen nachweisen, dass Caspase-3 eines der Schlüssel- und Effektorenzyme des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens darstellt (298, 336). Ebenso konnten die hier erhobenen Daten zeigen, dass Caspase-3-Aktivierung durchaus in signifikanter Weise einerseits im hepatischen IRI erhöht wird, andererseits durch die Inhibition von 12/15-LOX vermindert wird. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Situation in vivo durchaus differenzierter betrachtet werden kann. Gestützt wird diese Schlussfolgerung auch durch die Tatsache, dass das internationale Komitee für die Nomenklatur des Zelltods (NCCD) in seiner 2012 veröffentlichten, revidierten Klassifikation explizit auf die unterschiedlich zu wertenden Charakteristika von in vitro- und in vivo-Zelltod eingeht (90). Ferner stellt Caspase-3 das gemeinsame proapoptotische Effektorenzym der extrinsischen TNF-basierten, sowie der intrinsischen Cytochrom C-abhängigen Apoptosekaskade dar (90, 149). Als Schlussfolgerung der beschriebenen Daten muss davon ausgegangen werden, dass im Rahmen des hepatischen

144

IRI beide Apoptosewege angesprochen werden und durch Baicalein gehemmt werden können.

Neben Caspase-3 konnte ebenfalls eine signifikante Abnahme von PARP- und JNK-Aktivierung nach 12/15-LOX-Hemmung nachgewiesen werden, weshalb diesen Molekülen ebenfalls eine relevante Rolle in einer Caspase-abhängigen Zelltodentwicklung innerhalb der Gpx4-Signalkaskade zugeschrieben werden könnte. Explizit in Bezug auf PARP erscheint diese Schlussfolgerung logisch, da PARP als nachgeschaltetes Enzym in der Caspase-3-Kaskade gespalten und aktiviert wird, womit eine weitere Zelltodvermittlung einhergeht (97-99). Andererseits konnten für PARP ebenfalls caspasenunabhängige Wirkweisen beschrieben werden, welche mit AIF-Induktion vergesellschaftet waren und zum Zelluntergang führten (90). Daher konnte PARP auch als ein Initiator der regulierten Nekrose, analog zur Nekroptose durch ATP- und NAD⁺-Depletion, nachgewiesen werden (90). JNK hingegen ist bekannt dafür, im Rahmen von Stressreaktionen, die von extrazellulären Signalen ausgehen, Apoptose zu vermitteln (91, 337). Bereits zuvor konnten hierbei ROS als effektiver JNK-Aktivatoren nachgewiesen werden, indem sie zu einer vermehrten Phosphorylierung von JNK über MAP-Kinasen führten und somit Apoptose über Aktivierung von Transkriptionsfaktoren proapoptotischer Gene vermittelten, sowie mitochondriale Zelltodkaskaden über ein vermehrtes Cytochrom C-Angebot aktivierten (91, 337). Da in der hier dargestellten Versuchsreihe ebenfalls ROS als zentrale Effektormoleküle vermutet werden, erscheint die Schlussfolgerung, dass JNK von Relevanz in der Gpx4-abhängigen Signalkaskade von Relevanz ist, nur logisch. Auch hierbei ist davon auszugehen, dass sowohl die intrinsische, wie auch die extrinsische Zelltodkomponente angesprochen werden. Da auch ERK mit vermehrter Cytochrom C-Freisetzung durch die Modulation der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinfamilie, Caspase-3- und PARP-Aktivierung assoziiert ist und durch extrazelluläre Signale wie ROS aktiviert werden kann, wurde erwartet, dass auch bei ERK1/2 signifikante Expressionsalterationen beobachtet werden könnten (92). Im Gegensatz zu PARP, JNK und Caspase-3 konnte für ERK jedoch keine statistische Signifikanz in Bezug auf dessen Aktivitätsabnahme nach Baicalein-Therapie erzielt werden, wenngleich ein negativer Regulationstrend zu verzeichnen war. Dies könnte eventuell dadurch zu erklären sein, dass kinetische Analysen zur ERK-Aktivierung zeigen konnten, dass nach Eintreten eines Zelltodreizes bereits innerhalb der ersten 20 Minuten die hauptsächliche Phosphorylierung und somit Aktivierung von ERK zu verzeichnen ist, was wiederum in einem raschen Abfall der messbaren ERK-Phosphorylie-

ung mündet (338). In dem hier dargestellten Tiermodell entspricht dieser Zelltodreiz somit am ehesten der Initiierung der Reperfusion, in dessen Folge erst nach 90 Minuten das Lebergewebe zur weiteren Diagnostik entnommen wurde. Da zu diesem Zeitpunkt zumindest noch ein negativer Regulationstrend der ERK-Aktivierung nachzuweisen war, sollte ERK1/2 als relevant innerhalb der Gpx4-Signalkaskade des hepatischen IRI erwähnt werden. Einschränkung muss jedoch festgehalten werden, dass ERK1/2 nicht ausschließlich mit Apoptoseentwicklung vergesellschaftet ist, da ihr auch eine lysosomale und autophagische Zelltodkomponente zugeschrieben werden kann (92).

Der relevante Nachweis des Einflusses der großteilig propapoptotisch fungierenden Mediatoren ERK1/2, PARP, JNK und Caspase-3 innerhalb des hier gezeigten Experiments zur Gpx4-abhängigen Signalkaskade deutet zwar auf einen relevanten Anteil von Apoptose am beobachteten Zelltod hin, sollte jedoch nicht als alleinig relevant gewertet werden. Entsprechend den zuvor beschriebenen alternativen Zelltodmechanismen und deren Relevanz in Bezug auf Gpx4 sollten beispielsweise Ferroptose und Nekroptose ebenfalls in dieser Kaskade Berücksichtigung finden. Darüber hinaus weisen die genannten Mediatoren bei Weitem keine streng apoptosespezifischen Charakteristika mehr auf. So konnten beispielsweise ERK und JNK neben p38 ebenfalls in reinen Ferroptose-Modellen als modulatorisch von Bedeutung nachgewiesen werden (113). Dieses Beispiel zeigt daher die Schwierigkeit den Anteil eines bestimmten Zelltodmediators an einer spezifischen Zelltodform nachzuweisen.

Dennoch ist davon auszugehen, dass Caspase-3 und PARP durch ihre zuvor zahlreich beschriebenen Rollen in Apoptoseentwicklung, sowie im hepatischen IRI als zentrale und spezifische Zelltodmediatoren, vor allem der Apoptose und regulierten Nekrose, zu werten sind (90, 336, 339). JNK und ERK sind im Gegensatz hierzu eher als unspezifische Indikatoren für zelluläre Stressreaktionen beschrieben, weshalb diese zunächst an einer früheren Stelle der Signaltransduktionskette zu vermuten sind (340, 341). Daher könnte allein die rein antioxidative Wirkung des Baicalein bereits einen positiven Einfluss auf deren Zelltodmediation haben, was sich wiederum über verschiedene Formen des Zelltods auswirken könnte.

5.3.5 Hepatoprotektivität von DMSO

Um ein valides Ergebnis erzielen zu können, wurde DMSO als Trägelösung für Baicalein ebenfalls in Bezug auf ihren Einfluss auf Zelltod und Mediatormechanismen untersucht. Hierbei wurde bewusst DMSO ausgewählt, da es nicht nur ein erstklassiges Trägermedium

darstellt, sondern auch zuvor in zahlreichen Studien anderer Autoren als postischäm hepatoprotektiv beschrieben werden konnte (236, 237). Die bisherigen Erklärungsansätze dieses Phänomens bezogen sich vor allen Dingen auf eine beobachtete, verminderte Kupfferzell-Aktivierung durch DMSO, was in der Folge mit einer verminderten Leukozytenadhäsion, inflammatorischen Reizantwort und somit verbesserter Mikrozirkulation vergesellschaftet ist (342). Dass die Kupffer-Zellen durch Modulation der Ausbildung reaktiver Sauerstoffspezies von zentraler Bedeutung für den hepatischen IRI sind, wurde bereits thematisiert (33, 343, 344). Darüber hinaus ist DMSO dafür bekannt, intrazelluläre Vitamin C-Speicher wieder auffüllen zu können, was ihm eine allgemein antioxidative Wirkung verleiht (345).

Die hier gezeigten Daten können weitere Erkenntnisse zum Verständnis der hepatoprotektiven Wirkung von DMSO beitragen. So konnte nicht nur eine leichtgradige Abnahme des Zelltods nach hepatischem IRI und DMSO-Vorbehandlung beobachtet werden, sondern auch eine tendenzielle Aktivitätszunahme des Glutathionmetabolismus, wenngleich diese Ergebnisse statistisch nicht signifikant waren. Dies könnte der verminderten Aktivität der zelltodvermittelnden PARP und JNK durch DMSO zugeschrieben werden, wobei zu beachten ist, dass diese Aktivitätsabnahme weniger stark ausfiel als nach Baicaleingabe. Ein relevanter Unterschied zur Baicalein-Therapie zeigt sich in Bezug auf die DMSO-Vorbehandlung, wenn man die Ergebnisse der Auswertung der Caspase-3- und ERK1/2-Aktivierung betrachtet. Während diese beiden, klassisch als proapoptotisch bezeichneten Enzyme nach Baicalein-Behandlung relevant aktivitätsgemindert untersucht wurden, zeigten sie nach alleiniger DMSO-Vorbehandlung keine relevante Aktivitätseinbuße. Aufgrund der Relevanz von Caspase-3 im hepatischen IRI ist somit potentiell die verminderte Zelltodreduktion durch DMSO im Vergleich zu Baicalein zu erklären.

Diese Ergebnisse legen daher nahe, dass ein Teil der hepatoprotektiven Wirkung von DMSO über einen ähnlichen Signalweg mediiert wird wie jener, der nach 12/15-LOX-Inhibition beobachtet werden konnte. Jedoch zeigt die 12/15-LOX-Inhibition einen weitaus deutlicheren Einfluss auf den Glutathionstoffwechsel und deren postulierte Zelltodmediatoren, allen voran Caspase-3. Da dies eines der zentralen Effektormoleküle des hepatischen IRI darstellt, liegt nahe, dass DMSO nicht komplett über dieselben Kaskaden fungieren kann wie die Gpx4-abhängige Signaltransduktion, deren Relevanz im hepatischen IRI zuvor beschrieben wurde (298, 336). Eher sprechen diese Ergebnisse für eine allgemein antioxidative, unspezifische

Wirkung des DMSO durch Abdämpfung von oxidativen Stressreizen über JNK-Aktivitätsmin-
derung und Abnahme caspase-basierter, regulierter Nekrose durch PARP-Reduktion (90,
339, 340).

5.3.6 Toxizität von DMSO und Baicalein

Die beobachteten, hepatoprotektiven Effekte, die für die verwendeten Einzelsubstanzen beobachtet werden konnten, wurden augenscheinlich auf den ersten Blick durch das Untersuchungsergebnis der Serumparameter getrübt. Während die Analyse der Nierenfunktion, biliären Sekretion und Lebersynthese keine relevanten Unterschiede erbrachte, waren es vor allen Dingen die Parameter der Leberzellschädigung GOT, GPT und GLDH, die es zu diskutieren galt. Hier fiel eine zumeist signifikante Zunahme dieser Parameter nach Ischämie und Reperfusion auf, obwohl die entsprechenden Auswirkungen auf das hepatische Zellüberleben doch konträr zu werten waren. Dieser Effekt sollte in der weiteren Folge als Folgeerscheinung der Toxizität der verwendeten Substanzen zu interpretieren sein.

Betrachtet man nämlich die vergleichende Zelltodanalyse nach Scheinoperation wird diese Interpretation erklärbar. Sowohl nach Baicalein-, als auch nach DMSO-Therapie waren signifikante Anstiege der Anzahl abgestorbener Zellen zu beobachten, wobei dieses Ausmaß nach DMSO-Therapie deutlich höher ausfiel als nach Baicalein-Vorbehandlung. Dieser Effekt muss daher als durch die Medikamente direkt induziert betrachtet werden und somit als Ausdruck der Toxizität. Diese Erkenntnis wird zudem durch die Tatsache unterstützt, dass die Versuchstiere einen zunehmend positiven Schockindex, der als Quotient aus Herzfrequenz und systolischem Blutdruck zum selben Zeitpunkt definiert ist, zu Beginn eines Experiments und somit nach Applikation von DMSO mit oder ohne Baicalein entwickelten (346). Dieser Effekt präsentierte sich nach einigen Minuten selbstlimitierend. Diese Beobachtung ist in der Literatur bei toxischen Ereignissen in Zusammenhang mit anderen Medikamenten bereits beschrieben, weshalb die Schlussfolgerung nahe liegt, diesen initialen Anstieg der Herzfrequenz im Rahmen der Medikamententoxizität zu werten (347, 348).

Explizit für DMSO konnten in den vergangenen Jahren zahlreiche, dosisabhängige toxische Effekte nachgewiesen werden. Diese beruhen vor allem auf der Wirkung von DMSO an Phospholipidmembranen, da hier mit steigender Dosis eine vermehrte Porenbildung induziert wird, was wiederum mit einer konsekutiven Membranpermeabilität und –zerstörung einhergeht (349). Die dosisabhängige Toxizität von DMSO konnte bereits ebenfalls nach ent-

sprechender Behandlung von in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Stammzellen nachgewiesen werden (350). Einhergehend mit den Beobachtungen der hier präsentierten Studie, konnte die Arbeitsgruppe um Jacob bereits im Jahre 1966 aufzeigen, dass toxische Konzentrationen von DMSO zu Leberzellschädigungen mit massiver Transaminasenfreisetzung führen (351). Diese Lebertoxizität wird je nach Applikationsart und Versuchstier rasse bei unterschiedlichen Schwellenwertkonzentrationen erzielt (351). Somit lag die maximal tolerierte Dosis von DMSO intraperitonealer Applikation bei 2500 mg/kg Körpergewicht bei Mäusen, während die mediane, letale Dosis zwischen 14670 und 20060 mg/kg Körpergewicht anzusiedeln war (351). In der hier dargestellten Versuchsreihe wurde eine DMSO-Dosis von 6600 mg/kg Körpergewicht angewandt, was somit deutlich oberhalb der maximal tolerierten Dosis, wenngleich noch unterhalb der median letalen Dosis lag. Der Grund hierfür ist bei der Löslichkeit des Baicalein zu suchen. Diese wird laut Hersteller bei 20 mg/ml DMSO angegeben, was bei einem applizierten Volumen von 150 µl einer Baicalein-Konzentration von 120 mg/kg Körpergewicht entspricht (181). Exakt diese relativ hohe Konzentration wurde in vorbeschriebenen Tierexperimenten mit Baicalein angewandt und etabliert (352, 353). Um eine valide Aussage über die Auswirkungen von Baicalein auf die Gpx4-abhängige Signalkette treffen zu können, wurde sich bewusst für eine entsprechend hohe Konzentration entschieden, zumal Vorläuferexperimente zu dieser Studie bei niedrigeren Baicalein-Stoffkonzentrationen keine reliablen Ergebnisse zeigten.

Die hier verwendete, außerordentlich hohe Konzentration von DMSO führte somit scheinbar zu einer relevanten, in Einklang mit der Literatur erwartbaren, toxischen Leberzellreaktion. Da dieser Effekt nach Baicalein-Therapie deutlich geringer ausfiel, ist schlussfolgernd zu postulieren, dass der Hauptanteil an Toxizität der Baicalein-Gabe durch den Trägerstoff DMSO verursacht wird. Vergleichbare Experimente mit signifikant geringeren DMSO-Dosen von 500 mg/kg Körpergewicht erbrachten nach Ischämie und Reperfusion der Leber beispielsweise keine gesteigerten GOT-, GPT- und GLDH-Werte (236, 237). Zudem kann die reduzierte toxische Reaktion nach Baicalein-Gabe durch dessen beschriebene protektive Wirkung in Bezug auf Phospholipidmembranen und somit auf eben jene vermutete zentrale Genese der DMSO-Toxizität erklärt werden (vgl. 5.3.3) (349).

Jedoch konnten auch Baicalein selbst bereits potentiell toxische Effekte nachgesagt werden. So soll Baicalein bei außerordentlich hohen Konzentrationen und langen Applikationszeit-

räumen den mitochondrialen Biostoffwechsel negativ beeinflussen, was in Zytotoxizität endet (354). Darüber hinaus sind Daten in der Literatur zu finden, die besagen, dass Baicalein ebenfalls die toxische Wirkung von Medikamenten wie platinhaltiger Chemotherapeutika verstärken kann, indem die interzelluläre Kommunikation über sogenannte „gap junctions“, also Zellenzwischenraumverbindungen, gesteigert wird (355). Diese Ergebnisse wurden allerdings bei Baicaleinkonzentrationen, die ein Vielfaches der hier verwendeten Dosis darstellen, erreicht und somit für die Interpretation der hier erlangten Ergebnisse nur bedingt geeignet.

Ferner ist der hepatoprotektive Effekt vor allem in der postischämischen Leber durch die verwendeten Substanzen als derart schützend zu betrachten, dass sich das Ausmaß der TUNEL-positiven Zellen nach IRI im Vergleich zu den toxischen Effekten offensichtlich amortisiert. Vor allem der gesteigerte Ausstrom von Transaminasen und GLDH ließ sich jedoch noch deutlich gesteigert nach Medikamentengabe nachweisen. Betrachtet man diesen Enzymausstrom aber mit Blick auf die errechneten relativen Steigerungsfaktoren eines Serumparameters, so konnte auch hier gezeigt werden, dass postischäm deutlich abnehmende Relativtendenzen für alle drei Parameter der Leberzellschädigung anzutreffen waren. Dies bedeutet, dass das Ausmaß der gesteigerten Freisetzung der Leberenzyme nach Induktion des IRI und medikamentöser Vorbehandlung mit Baicalein und DMSO großteilig signifikanterweise um ein Vielfaches geringer ausfiel als nach ausgebliebener Vorbehandlung. Interessanterweise fiel dieses Phänomen bei GOT und GLDH nach Baicaleingabe deutlich stärker aus als nach DMSO-Gabe, während die DMSO-Gruppe eine deutlichere GPT-Steigerungsabnahme aufwies. Wie diese spezifischen Toxizitätsverhalten zu werten sind, kann in der hier vorgelegten Studie nicht abschließend beurteilt werden und bedarf weiterer, zukünftiger Untersuchungen.

Somit bleibt festzuhalten, dass die toxischen Effekte der verwendeten Substanzen auch nach Ischämie und Reperfusion nachzuweisen sind, jedoch bei Weitem nicht mehr in dem Ausmaß wie in der scheinoperierten Gruppe, da die hepatoprotektiven Effekte postischäm die toxischen Reize der Medikamente zu einem gewissen Teil überwiegen.

5.3.7 Hepatoprotektivität und Toxizität von Tacrolimus

In der hier dargestellten Versuchsreihe wurden neben Baicalein und DMSO, denen eine antioxidative Wirkung bereits zuvor bescheinigt werden konnte, auch Tacrolimus und dessen

Einfluss auf den hepatischen IRI untersucht. Der Hintergedanke hiervon ist neben der immunsuppressiven vor allem in der antiinflammatorischen Wirkung des Tacrolimus zu finden. Entzündung stellt einen relevanten Teil in der Entstehung des hepatischen IRI dar (31). Vor allem der Einfluss von Kupffer-Zellen und CD4+-Zellen, welche über Zytokinausschüttung und damit einhergehender Mikrozirkulationseinschränkung Entzündungsreaktionen medieren, wird im Modell des hepatischen IRI als zentral angesehen (76, 356-358). CD4+-Zellen werden zudem als elementar wichtig für die Ausprägung des hepatischen IRI betrachtet, da sie neben ihrer eigenständigen Wirkung auch mit Kupffer-Zellen interagieren und somit zur einer verstärkten ROS-Ausbildung führen (31, 357, 358). Aufgrund dieser Zusammenhänge schien die Erforschung einer immunsuppressiven Medikamentenklasse nur sinnvoll, da durch die Reduktion der Immunantwort eben auch proinflammatorische Marker vermindert werden. Bisher wurden potentiell hepatoprotektive Effekte nämlich stets in diese Richtung gehend gewertet (vgl. 1.4.3).

Die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Daten konnten die vermuteten hepatoprotektiven Eigenschaften, vor allem jene nach Ischämie und Reperfusion, deutlich bestärken. In den postischämisch geschädigten Leberlappen war ein signifikanter Abfall von abgestorbenen Zellen mittels TUNEL-Assay nachzuweisen. Somit konnte bestätigt werden, dass eine Tacrolimus-Vorbehandlung, wie sie in diesem Experiment in für den Menschen durchaus üblicher Mengenkonzentration durchgeführt wurde, zu einem besseren postischämischen Leberzellüberleben führt.

Hieraus ergab sich in der weiteren Folge ebenfalls die Überlegung, über welche Mediatoren, die im Rahmen der Baicalein-Analyse bereits als relevant herausgestellt werden konnten, Tacrolimus gegebenenfalls seine hepatoprotektive Wirkung entfaltet. Neben der allgemein antiinflammatorischen Antwort ist in diesem Zusammenhang nur beschränktes Wissen über die postischämischen Wirkweisen des Tacrolimus bekannt. Auf der einen Seite könnten antiinflammatorische Wirkprofile wie die Hemmung der Endothelin-1-Ausschüttung postuliert werden, was in einer verbesserten Mikrozirkulation mündet (359). Andererseits sind aber auch allgemein antioxidative Wirkungen denkbar. So kann Tacrolimus Kupffer-Zellen in ihrer Wirkung direkt supprimieren und somit einen geringeren Anfall von reaktiven Sauerstoffspezies generieren (360). Zudem konnten bereits andere Calcineurininhibitoren wie das Cyclosporin A als spezifische MPT-Blocker herausgestellt werden, was ebenfalls zu verminder-

tem oxidativem Schaden führt (30). Einen weiteren Aufschluss liefern die hier vorgestellten Ergebnisse. Nachdem die antiapoptotischen Effekte des Tacrolimus' auf Hepatozyten schon in der Vergangenheit dargestellt werden konnten, deutet die hier beschriebene Modulation der proapoptotischen Proteine ebenfalls auf eine verminderte Apoptose hin (361, 362). Während bisher kein eindeutiger Nachweis der Effektormoleküle möglich war, konnte nun gezeigt werden, dass vor allen Dingen JNK und Caspase-3 nach IRI deutlich aktivitätsgemindert waren. Aufgrund der bereits dargestellten Relevanz von Caspase-3 für den hepatischen IRI ist somit auch die protektive Auswirkung auf den Zelltod erklärbar. Auch der Rolle des extrinsisch aktivierten Stressmediator JNK für den hepatischen IRI konnte in den Vorkapiteln bereits ausführlich dargestellt werden. Vergleichbar mit der Baicalein-Gruppe konnte nur ein geringgradiger, negativer Regulationstrend für das Stressreaktionsprotein ERK1/2 dargestellt werden, wobei dieses Ergebnis aufgrund der zeitlichen Latenz zwischen Gewebsentnahme und Reperfusionssreiz eingeschränkt zu betrachten ist (vgl. 5.3.4). Ein deutlich negativer Regulationstrend, wenngleich nicht signifikant, fiel erneut für PARP auf, einem klassischen Vertreter der regulierten Nekrose und Apoptose (90). Somit konnten sich ebenfalls sämtliche, klassischerweise proapoptotischen Proteine durch die Tacrolimus-Präkonditionierung affiziert zeigen, welche auch als relevant in der Gpx4-abhängigen Signalkaskade vermutet wurden (vgl. 5.3.4).

Noch deutlicher werden die Überschneidungen zur Gpx4-abhängigen Signalkaskade, wenn man den Einfluss von Tacrolimus auf die Glutathionoxidierung nach Ischämie und Reperfusion der Leber betrachtet. Hierbei konnte in der Tat ebenfalls eine signifikante relative Steigerung des oxidierten Produkts GSSG im Vergleich zum oxidierten Produkt der Glutathionperoxidase, GSH, nachgewiesen werden. Somit konnte ein eindeutig positiver oxidativer Einfluss auf den Glutathionmetabolismus durch Tacrolimus nachgewiesen werden. Aufgrund der vergleichbaren Ergebnisse, die nach Hemmung der 12/15-Lipoxygenase und nach Tacrolimusgabe festgestellt wurden, kann gemutmaßt werden, dass Tacrolimus die Gpx4-12/15-LOX-Interaktion auf ähnliche Weise beeinflusst wie Baicalein. Aufgrund der berichteten Relevanz der Gpx4-abhängigen Signalkaskade im Rahmen der Ferroptoseentwicklung könnte Tacrolimus somit neben der bekannten, hepatozytenspezifischen, antiapoptotischen Eigenschaft gegebenenfalls sogar ein hemmender Einfluss auf die Ausbildung dieser spezifischen Unterform des Zelltods zugeschrieben werden (111, 180, 334, 361, 362). Diese Hypo-

these kann selbstverständlich mit den aktuell verfügbaren Daten nicht endgültig bestätigt werden und muss in kommenden Experimenten weiter untersucht werden.

Dass Tacrolimus und der Glutathionstoffwechsel in postischämischen Lebern in einer bisher nicht weiter definierten Verbindung zu stehen scheinen, konnten Lebertransplantationsexperimente an Ratten, deren Lebertransplantate ex vivo mit Tacrolimus gespült wurden, bereits zeigen (216). Aus diesem Grunde wurden weiterführende Studien wie die TOP-Studie beim Menschen initiiert, die den Einfluss einer extrakorporalen Tacrolimusspülung von Spenderlebern unmittelbar vor einer Lebertransplantation untersuchen sollte (190). Jedoch war es dieser Studie nicht möglich, signifikante, positive Effekte der Tacrolimusspülung ex vivo aufzuzeigen, mutmaßlich aufgrund des Studiendesigns mit Marginalorganen und fehlender Spenderpräkonditionierung (363).

Interessanterweise zeigte die Evaluation der Parameter der Leberzellschädigung deutlich andere Ergebnisse als jene der Baicalein- und DMSO-Gruppe. Hier konnte keine signifikant gesteigerte Ausschüttung der Transaminasen und GLDH im Blut nach Scheinoperation, sowie nach IRI-Induktion im Vergleich zur unbehandelten Gruppe festgestellt werden. Gegenteiligerseits war sogar eine relative Abnahme dieser Laborwerte, im Falle von GPT sogar signifikant, im hepatisch postischämischen Organismus festzustellen. Dies dürfte einerseits durch die zuvor ausführlich dargestellte, hepatoprotektive Wirkung des Tacrolimus zu werten sein. Darüber hinaus war sogar eine leichtgradige Syntheseleistungssteigerung der Leber nach Scheinoperation und Tacrolimustherapie darzustellen, was sich jedoch nicht in der postischämischen Gruppe reproduzieren ließ. Andererseits dürften diese Effekte wohl auch dahingehend interpretiert werden, dass Tacrolimus ein deutlich unterschiedliches toxisches Profil besitzt als die anderen, untersuchten Substanzen. Dass Tacrolimus auch hepatotoxisch wirken kann, ist bekannt (364-368). Während in der täglichen Arbeit mit tacrolimustherapierten Patienten vor allen Dingen die Nephrotoxizität aufgrund der engen therapeutischen Breite von Tacrolimus im Vordergrund steht, ist in den vergangenen Jahren der Fokus auch auf die hepatotoxische Wirkung von Tacrolimus, explizit bei lebererkrankten Patienten, gefallen (364, 365). Als Genese wird hierbei oxidativer Stress, welcher durch Tacrolimus selbst verursacht wird, diskutiert, wenngleich ein Effekt auf die metabolische Funktion von Hepatozyten im Zellversuch nicht nachgewiesen werden konnte (365, 366, 369). Insbesondere ein Einfluss von Tacrolimus auf die Superoxiddismutase, einem Enzym,

welches in der ROS-Entstehung von zentraler Bedeutung ist, erscheint hierbei von Relevanz (365). Dies würde natürlich im Gegensatz zur dargestellten hepatoprotektiven und antioxidativen Eigenschaft Tacrolimus' stehen.

Auch in den hier dargestellten Daten konnte ein potentiell toxischer Effekt von Tacrolimus dargestellt werden, da die scheinoperierte Gruppe nach Tacrolimus-Vorbehandlung eine signifikant höhere Anzahl abgestorbener Zellen aufwies. Da dies offensichtlich nicht mit einem vermehrten Ausstrom von Leberzellschädigungsparametern ins Blut einherging, könnte postuliert werden, dass sich die Toxizität von Tacrolimus anderweitig auswirkt als jene, die bei Baicalein und DMSO beobachtet wurde. Dahingehend ist auch die unterschiedliche Auswirkung auf das anfängliche Blutdruck- und Herzfrequenzverhalten zu werten, welche nach Tacrolimustherapie keine signifikante Änderung zur unbehandelten Gruppe aufweist, während in der Baicalein- und DMSO-Gruppe anfänglich weitaus positivere Schockindizes erzielt werden. Potentielle Erklärungsansätze könnten darin zu finden sein, dass die Tacrolimusgabe bereits 24 Stunden vor der geplanten Operation erfolgte und somit ein Ausstrom von Transaminasen beispielsweise schon frühzeitig erfolgte und zum Entnahmezeitpunkt nicht mehr messbar war. Die Zellen könnten ebenfalls zu einem früheren Zeitpunkt bereits untergegangen sein, sodass dieser Zelltod nicht erst im Rahmen der Scheinoperation auftrat. Im Einklang mit Literatur ist auch möglich, dass Tacrolimus das Lebergewebe anfälliger für Leberschäden macht und somit die Scheinoperation schon einen derartigen Zelluntergang verursacht (364). Hierdurch wäre andererseits der fehlende Anfall von Transaminasen kaum zu erklären. Diese Theorien können durch die hier gezeigten Daten jedenfalls nicht erklärt werden. Welche dieser Hypothesen schlussendlich auch zutrifft, das Toxizitätsverhalten von Tacrolimus ist als weitaus weniger schädlich als jenes von DMSO mit oder ohne Baicalein einzustufen und wird durch seine leberschützenden Eigenschaften im IRI-Modell deutlich überwogen.

5.3.8 Fehlende Steigerung eines Therapieeffekts durch die Kombinationstherapie aus Baicalein und Tacrolimus

Nachdem sowohl für Tacrolimus, als auch für Baicalein ein protektiver Effekt auf die Ausbildung des hepatischen Zellschadens nach Ischämie und Reperfusion in mehreren Publikationen, sowie in den Vorkapiteln aufgezeigt werden konnte, lag die Schlussfolgerung nahe, eine Kombination beider Medikamente in Bezug auf einen potentiell gesteigerten Therapieeffekt

zu untersuchen. Die zellschützenden Wirkweisen beider Medikamente konnten dank der hier beschriebenen Daten in den Vorkapiteln weiter beleuchtet werden. Jedoch wurde eine Kombination beider Therapeutika bisher nicht ausreichend untersucht.

Wie zu erwarten war, führte auch die Kombination der beiden, in den Vorkapiteln ausführlich als hepatoprotektiv beschriebenen Substanzen Baicalein und Tacrolimus zu einer signifikant reduzierten Anzahl abgestorbener Zellen. Somit verringert also auch die Kombinationstherapie dieser beiden Medikamente den Zelltod nach hepatischer Ischämie und Reperfusion. Betrachtet man hierbei nun aber den Vergleich zu den einzeln untersuchten Therapieansätzen von Tacrolimus und Baicalein, ist festzustellen, dass es zu keiner zusätzlichen Steigerung der Zelltodabnahme durch die Kombinationstherapie kommt. Dafür, dass allerdings die beobachteten, hepatoprotektiven Eigenschaften der Kombinationstherapie nach Ischämie und Reperfusion der Leber auch durch den positiven Einfluss auf die Glutathionoxidierung zu erklären sind, lieferten die Untersuchungen des Glutathionmetabolismus ausreichend Hinweise. So konnte erneut vermehrt oxidiertes GSSG im Vergleich zu reduziertem GSH gemessen werden, was für eine gesteigerte Glutathionperoxidase-Aktivität spricht, analog zu den Vorkapiteln mutmaßlich durch Gpx4 (vgl. 5.3.3 und 5.3.7). Jedoch konnte auch hierbei kein gesteigerter Glutathionoxidierungseffekt durch die Kombination Substanzen Baicalein und Tacrolimus beobachtet werden. Ferner lieferte auch die Analyse der proapoptotischen Proteine ein analoges Bild. Zwar wurden auch die für den hepatischen IRI relevanten Enzyme Caspase-3 und PARP durch die kombinierte Vortherapie signifikant in ihrer Aktivität reduziert, sowie die ERK1/2- und JNK-Aktivität zumindest leichtgradig negativ reguliert, jedoch war bei keinem dieser Enzyme eine signifikant verstärkte Negativregulation im Vergleich zu den Ergebnissen nach jeweiliger Einzeltherapie festzustellen. Die hier dargestellten Daten lassen somit den Schluss zu, dass eine kombinierte Therapie mit Tacrolimus und 12/15-LOX-Hemmung zwar in ähnlicher Weise hepatoprotektiv nach hepatischem IRI wirkt und somit auch die Gpx4-abhängige Signalkaskade zum Zellüberleben hin positiv beeinflusst, jedoch keinen zusätzlichen Zellschutz oder gesteigerten Mediatoreinfluss nach hepatischer Ischämie und Reperfusion bietet als die Therapie mit den jeweiligen Einzelsubstanzen.

Was jedoch im Rahmen der Analysen der Kombinationstherapie auffiel, ist, dass in der scheinoperierten Versuchsgruppe erneut signifikant vermehrt abgestorbene Zellen nach

kombinierter Vorbehandlung mit Baicalein und Tacrolimus nachzuweisen war. Dieser Effekt könnte analog zu den Untersuchungen in Kapitel 5.3.6 und 5.3.7 als durch die Hepatotoxizität der Einzelsubstanzen verursacht zu sein gewertet werden. Da Tacrolimus vor allen Dingen seine hepatotoxische Wirkung in (vor)geschädigtem Lebergewebe entfaltet und eine toxische Leberschädigung – wie vorbeschrieben – nach DMSO-Gabe eintritt, könnte dies erklären, warum die toxizitätsbezogene Zelltodanalyse der kombinierten Therapie sogar ausgeprägter ausfällt als bei der Untersuchung der jeweiligen Einzelsubstanzen, wenngleich dies nicht statistisch signifikant war (364). Die Theorie der Toxizitätsbelastung des Gewebes wird darüber hinaus durch die Analyse der Kreislaufparameter in der scheinoperierten Gruppe gestützt. Während des gesamten Experiments führt die kombinierte Vortherapie zu einer signifikanten Abnahme des arteriellen Mitteldrucks, sowie zu einer deutlichen Zunahme der Herzfrequenz. Auch dies kann als systemische, toxische Reaktion zu werten sein, wie sie auch bei der Analyse der Einzelsubstanzen Baicalein und DMSO auffiel. Dass es bei Kombination mit Tacrolimus nun nicht zu der in den entsprechenden, anderen Gruppen beobachteten, raschen Normalisierung dieser Werte kam, könnte ebenfalls durch eine Steigerung des toxischen Potenzials der Einzelsubstanzen in Kombinationstherapie zu erklären sein. Auch in der IRI-induzierten Gruppe waren im Durchschnitt, teils auch signifikant, niedrigere Blutdruckwerte und höhere Herzfrequenzraten festzustellen, jedoch nicht in dem Ausmaß wie nach Scheinoperation. Erneut könnte diese angedeutete, relative Normalisierung der Kreislaufparameter auf die postischämisch positiven Effekte der Kombinationstherapie zurückzuführen sein – ein Phänomen, welches bereits in den Vorkapiteln diskutiert wurde. Ebenfalls für die Theorie der gesteigerten Toxizität durch die Verwendung mehrerer, potentiell hepatotoxischer Substanzen spricht die erneut gesteigert gemessene Transaminasen- und GLDH-Ausschüttung ins Blut. Während dies nach alleiniger Tacrolimus-Präkonditionierung nicht festzustellen war und hierbei sogar erniedrigt gemessene Leberzellschädigungsparameter im Serum anzutreffen waren, wurde dieser Tacrolimus-Effekt durch die Kombinationstherapie diametral geändert. Vor allem GOT und die GLDH waren erneut betroffen. Jedoch waren es auch erneut exakt diese Werte, deren Steigerung nach IRI-Induktion aufgrund der hepatoprotektiven Effekte der angewandten Therapie nicht so ausgeprägt ausfiel wie ohne Vorbehandlung. Eine relevante Verbesserung des relativen Steigerungsfaktors dieser Laborparameter beispielsweise im Vergleich zur alleinigen Baicalein-Therapie war allerdings nicht festzustellen.

Somit bleibt festzuhalten, dass von einer gesteigerten Hepatotoxizität durch die Kombination der verwendeten Substanzen ausgegangen werden muss, wenngleich postischämisch hepatoprotektive Effekte durchaus festzustellen waren. Jedoch konnten diese positiven Therapieeffekte durch die Kombination der Einzelsubstanzen im Vergleich zu deren alleiniger Nutzung nicht relevant gesteigert werden. Hierfür könnte man zwei Hypothesen, die es in Zukunft zu untersuchen gilt, diskutieren. Einerseits könnte die beschriebene Toxizitätssteigerung durch den Einsatz der Kombinationstherapie potentiell stärkere Therapieeffekte nivellieren. Andererseits könnte diskutiert werden, dass Tacrolimus und Baicalein beide in die Gpx4-abhängige Kaskade eingreifen und dadurch gewisse Signalketten bereits durch den Einsatz eines der beiden mutmaßlich zumindest teilweise synergistisch wirkenden Medikamente effektiv blockiert werden. Dadurch könnte das zweite Medikament seine entsprechende Wirkung nicht mehr adäquat entfalten.

5.4 Wertung und Ausblick

Die hier vorgelegten Studienergebnisse konnten weitere Einblicke in die molekularbiologischen Wirkweisen der Gpx4-abhängigen Signalkaskade erlauben, die Relevanz dieser Kaskade im hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden aufzeigen und somit das Verständnis für die Pathogenese dieser zentralen Komplikation der Transplantationschirurgie verbessern. Zudem gelang es, die Interaktion dieser Signalkaskade mit den beiden etablierten Medikamenten Tacrolimus und Baicalein fundiert darzustellen und im Kontext der bereits vorhandenen Literatur wissenschaftlich zu beleuchten. Zwar konnten einige Studien zuvor bereits zeigen, dass die Hemmung von 12/15-LOX scheinbar zu einer Steigerung der Glutathionoxidierung führt, sowie dass gesteigerte 12/15-LOX-Aktivität mit vermehrtem Zelltod einhergeht (115). Jedoch konnten diese linearen Zusammenhänge bisher noch nicht auf adäquate Weise in einem in-vivo-Modell mit Wildtyp-Versuchstieren für den hepatischen IRI bestätigt werden, was dieser Studie gelang. Zudem waren die exakten Zelltodmechanismen und –kaskaden des hepatischen IRI bislang ebenfalls noch nicht mit letzter Gewissheit erforscht, wozu diese Studie zumindest mit dem Nachweis relevanter Zelltodmediatoren zusätzliche Erkenntnisse liefern konnte. Die prinzipielle Interaktion von Tacrolimus mit dem Glutathionstoffwechsel konnte ebenfalls bereits in früheren Studien dargelegt werden (216). Jedoch gelang es dieser Studie, diese Interaktion noch detaillierter als zuvor zu beschreiben und in den Kontext mit den ebenfalls beschriebenen, neuen Erkenntnissen zum hepatischen IRI und

der Gpx4-Kaskade zu stellen. Somit können diese Studienergebnisse durchaus als Anstoß für weitere Entwicklungen der medikamentösen Therapie und Prävention des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens, wie auch als Initiator einer neuen Diskussion über eine potentiell breitere Indikation für den Einsatz zweier etablierter Medikamente verstanden werden.

Darüber hinaus ist die Problematik des Ischämie-Reperfusionsschadens nicht exklusiv auf die Transplantation beschränkt. Bei ausgedehnten Leberresektionen oder solchen, die aufgrund anatomischer Begebenheiten oder tumorbedingt einen erhöhten intraoperativen Blutverlust erwarten lassen, kann beispielsweise intermittierend das sogenannte Pringle-Manöver angewandt werden (370-372). Hierbei wird mithilfe einer Klemme oder eines Tourniquets das Ligamentum hepatoduodenale und somit der Bluteinstrom via Vena portae und Arteria hepatica gedrosselt, wenn nicht komplett unterbunden (370, 372). Durch den verminderten Einstrom von Blut und der hierdurch erzielten intrahepatischen Hypotonie sollen sich auch komplexe Resektionen mit überschaubarem Blutverlust durchführen lassen, wenngleich der Einsatz und vor allen Dingen der Nutzen des Manövers in den letzten Jahren kontrovers diskutiert wurde (370, 372, 373). Allerdings konnten auch nach Beendigung des Pringle-Manövers und der daraus resultierenden Reperfusion mit sauerstoff- und nährstoffreichem Blut oxidativer Stress mit der Konsequenz von hepatischen IRI beobachtet werden (374). Somit können die in dieser Studie erhobenen Daten und Schlussfolgerungen nicht nur für die Transplantationschirurgie, sondern für die Leberchirurgie im Allgemeinen von Relevanz sein und weitere therapeutische Ansätze folgen lassen.

Ferner tritt nach ausgedehnten Leberresektionen nicht selten eine zumindest passagere, teilweise Funktionseinschränkung der Leber auf, die allgemein als sogenanntes „Small-for-Size-Syndrom“ bekannt ist (375). Dieses beruht darauf, dass der verbliebene Leberrest aufgrund seiner geringen Größe reversibel oder teils auch irreversibel nicht in der Lage ist, die benötigte Synthese- und Exkretionskapazität für den gesamten Bedarf des Organismus aufzubringen (376). Dies kann ebenfalls bei Lebertransplantationen auftreten, bei denen ein „Größenmismatch“ zwischen Spender und Empfänger zu verzeichnen ist, also ein relativ kleines Spenderorgan in einen relativ zu großvolumigen Spenderorganismus transplantiert wird (376, 377). Neben des reinen Größenunterschieds wird hierbei auch eine oxidative Zellschädigung der Restleber als Pathogenese des „Small-for-Size-Syndroms“ diskutiert, bei der

eine relative Hyperperfusion, vor allem durch die Pfortader, ätiologisch diskutiert wird (375, 378, 379). Dieser Zellschaden erscheint daher dem IRI sehr ähnlich zu sein, da er mutmaßlich auf ähnlichen Grundprinzipien der Entstehung beruht (375). Aus diesem Grunde wird unsere Arbeitsgruppe versuchen, in weiteren Experimenten auf Boden der hier dargestellten Ergebnisse die Rolle des Glutathionstoffwechsels mitsamt der beschriebenen Wirkweisen auch im hyperperfundierten Lebergewebe nach ausgedehnter Leberresektion zu untersuchen. So könnte gegebenenfalls ein weiterer Einblick in die Pathogenese des Hyperperfusions-schadens der Leber gewonnen werden.

Die hier gezeigten Ergebnisse erbrachten neben den unbestritten hepatoprotektiven Effekten nach IRI-Induktion durch die applizierten Medikamente auch den Nachweis von Toxizität durch deren Einsatz. Diese Toxizität schien sowohl den Gesamtorganismus, wie auch die Leber direkt zu affektieren. Besonders fiel hierbei die unterschiedliche Ausprägung der Toxizität durch die verwendeten Medikamente Baicalein, DMSO und Tacrolimus auf. Wenngleich die meisten beobachteten toxischen Effekte durch die positiven Effekte amortisiert zu sein schienen, kann sich dies im klinischen Einsatz selbstverständlich anders darstellen. Um von den hier gewonnen Ergebnissen also zu einem potentiellen Einsatz im klinischen Umfeld zu gelangen, müssen potentielle medikamentöse Lösungsansätze, die 12/15-LOX hemmen, einer wissenschaftlichen Risiko-Nutzen-Analyse streng unterzogen werden. Dem muss eine spezifische Analyse der Toxizitätsentwicklung der beschriebenen Medikamente vorausgehen. Entsprechende Experimente zu Dosisfindung und noch tiefgründigerer Toxizitätsanalyse befinden sich derzeit in Vorbereitung durch unsere Arbeitsgruppe.

Der positive Effekt von Tacrolimus auf den hepatischen IRI konnte in dieser Studie bestätigt und noch weiter ergründet werden. Vorherige Studien, die den Einsatz von Tacrolimus als Spüllösung marginaler Organe vor einer Transplantation untersuchten, konnten jedoch keine positive Abweichung des Organ- oder Patientenüberlebens nachweisen (363). Betrachtet man die hier gezeigten Daten erscheint dies insofern erklärbar, da in einem ex-vivo-Einsatz von Tacrolimus mutmaßlich nicht die Zellpräkonditionierung erreicht wird wie in einem perfundierten Organismus und 24-stündiger Therapiezeit. Als logische Schlussfolgerung könnte man also ziehen, dass die Tacrolimustherapie schon vor Eintritt der Ischämie erfolgen müsste, was in der Transplantation die Therapie des Spenders vor Explantation voraussetzen würde. Dass dies eine erhöhte logistische Herausforderung bedeutet und auch zusätzliche

ethische Fragestellungen aufwirft, erscheint klar und bedarf daher einer gründlichen Vorbereitung, sollte man eine entsprechende klinische Studie erwägen.

Auch wenn derartige klinische Studien aus genannten Gründen mutmaßlich äußerst schwierig zu realisieren sind, wird es in Zeiten des Organmangels, in denen vermehrt marginale Organe zur Transplantation akzeptiert werden, notwendig sein, entsprechende Lösungsansätze zu suchen. Damit einhergehend konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass marginale Spenderorgane deutlich anfälliger für Ischämie und somit für das Ausmaß des IRI sind, wodurch die bereits bei Allokation reduzierte Organqualität zusätzlich herabgesenkt wird (20). In diesem Zusammenhang nimmt die Erforschung des IRI also eine immer wichtigere Rolle ein. Diese Studie kann daher dazu beitragen, die genauen Abläufe des hepatischen IRI noch besser zu verstehen und einen Grundstein für potentielle Therapieansätze zur Vermin- derung des Ausmaßes des hepatischen IRI zu legen.

6. Zusammenfassung

Hintergrund

In Zeiten des Organmangels, in denen vermehrt marginale Spenderorgane zur Transplantation akzeptiert werden, steht die Erforschung potentieller Mechanismen der Verbesserung von Organqualität und Verlängerung von Transplantatüberleben im Vordergrund. Der hepatische Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) stellt hierbei eine der zentralen Komplikationen nach Lebertransplantationen dar, weil er das Organüberleben signifikant einschränkt. Der hepatische IRI entsteht durch die Ausbildung von oxidativem Stress nach der Gewebsreperfusion, ist charakterisiert durch ein komplexes Zusammenspiel aus Mikrozirkulationsstörung, zellulärer Immunantwort, sowie proinflammatorischen Mediatoren und mündet in unterschiedlichen Formen des Zelltods. In den letzten Jahren konnte die Relevanz der Glutathionperoxidase-4 (Gpx4) -abhängigen Signalkaskade, in welcher die 12/15-Lipoxygenase (12/15-LOX) als Lipidperoxidquelle einen oxidativen Zelltodinitiator darstellt, im IRI anderer Organsysteme nachgewiesen werden. Jedoch konnten die genauen Wirkmechanismen und Zelltodmediatoren der Gpx4-abhängigen Signalkaskade bisher noch nicht vollständig geklärt werden. Zudem wurde das etablierte Immunsuppressivum und Calcineurininhibitor Tacrolimus in den vergangenen Jahren immer wieder mit einer Wirkung auf den Glutathionmetabolismus in Verbindung gebracht, wenngleich auch hier die genaue Interaktion nicht endgültig beschrieben werden konnte. Ziel dieser Studie war daher, die Relevanz der Gpx4-abhängigen Signalkaskade für den hepatischen IRI zu erörtern, neue Erkenntnisse über potentielle Mediatormechanismen zu erlangen und die Interaktion dieser Signalkaskade mit Tacrolimus zu beleuchten.

Methoden

An Lebern von C57BL/6-Mäusen wurde unter peritoneal applizierter Narkose operativ ein hepatischer IRI induziert, indem der gemeinsame Pedikel des rechten anterioren, linken anterioren und linken posterioren Lebersegments für 60 Minuten abgeklemmt wurde, was eine 65%ige Leberischämie zur Folge hatte. In der weiteren Folge erfolgte eine 90-minütige Reperusionsphase. Die verschiedenen Versuchstiere wurden entsprechend ihrer Experimentalgruppe ohne medikamentöse Vorbehandlung untersucht, beziehungsweise nach 30-minütiger Vorbehandlung mit Baicalein, einem potenten Hemmstoff der 12/15-LOX, und der Trä-

gerlösung von Baicalein, DMSO. Zudem wurde eine Versuchsgruppe 24 Stunden vor Laparotomie mit Tacrolimus vorbehandelt, sowie eine Versuchsgruppe kombiniert mit Tacrolimus und Baicalein. Das Gewebe der postischämischen Lebersegmente wurden hinsichtlich des Zelltodausmaßes mittels TUNEL-Assay quantifiziert, bezüglich der proapoptischen Proteine ERK1/2, JNK, PARP und Caspase-3 mithilfe von Western Blot-Analysen analysiert und für die Bestimmung der Glutathionextinktion spektralphotometrisch untersucht. Ferner erfolgten eine laborchemische Auswertung der Mausseren zum Ende des Experiments in Bezug auf Leber- und Nierenparameter, sowie eine kontinuierliche, intraarterielle Kreislaufüberwachung. Für sämtliche Versuchsgruppen wurden zudem scheinoperierte Kontrollgruppen anhand derselben Verfahren untersucht.

Ergebnisse

Die Analyse der TUNEL-Assays ergab eine signifikante Abnahme abgestorbener Zellen nach IRI-Induktion und Vorbehandlung mit Baicalein (-74,8%; $p < 0,001$), Tacrolimus (-61,8%; $p < 0,01$) und der kombinierten Vortherapie mit beiden Medikamenten (-62,3%; $p < 0,001$). Nach alleiniger DMSO-Therapie konnte zumindest ein negativer Regulationstrend hinsichtlich der Zelltodabnahme festgestellt werden (-23,2%). Die Western Blot-Analysen ergaben eine tendenzielle Mindereexpression von ERK1/2 nach Baicalein- (-36,8%), Tacrolimus- (-19,1%) und Kombinationstherapie (-28,1%), sowie eine signifikante Abnahme der Aktivität von JNK durch Baicalein- (-83,0%; $p < 0,01$), DMSO- (-69,7%; $p < 0,05$) und Tacrolimusgabe (-84,6%; $p < 0,05$), von PARP durch Baicalein- (-73,8%; $p < 0,05$), DMSO- (-68,9%; $p < 0,05$) und Kombinationstherapie (-80,1%; $p < 0,05$), wie auch von Caspase-3 nach Baicalein- (-45,0%; $p < 0,001$), Tacrolimus- (-66,9%; $p < 0,001$) und kombinierter Applikation (-59,2%; $p < 0,001$). Ein negativer Regulationstrend der PARP-Aktivität konnte auch nach Tacrolimusgabe verzeichnet werden (-59,9%). Zudem war eine signifikante Steigerung des oxidativen Glutathionmetabolismus nach Baicalein- (+45,7%; $p < 0,05$), Tacrolimus- (+75,1%; $p < 0,05$) und kombinierter Therapie (+43,7%; $p < 0,05$) festzustellen. Während allein die Gabe von Baicalein, DMSO oder der Kombinationstherapie zu einer signifikant gesteigerten Ausschüttung der Transaminasen und GLDH ins Blut führte, konnte eine relative Abnahme der postischäm erfassten Laborwerte nach Baicalein- (GOT -56,4%; $p < 0,001$; GPT: -16,8%; GLDH -62,1%; $p < 0,001$), DMSO- (GOT -36,5%; $p < 0,01$; GPT -43,7%; $p < 0,001$; GLDH -40,0%; $p < 0,001$), Tacrolimus- (GOT -28,8%; $p < 0,05$; GPT -53,4%; $p < 0,001$; GLDH -3,4%) und der Kombinationstherapie (GOT -

64,4%; $p < 0,001$; GPT -10,4%; GLDH -47,1%; $p < 0,001$), größtenteils signifikant, gemessen werden.

Schlussfolgerung

Die Vorbehandlung mit Baicalein führt zu einer signifikanten Zelltodabnahme nach hepatischem IRI, sowie zu einer signifikanten Steigerung der Glutathionoxidierung. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Gpx4-abhängige Signalkaskade eine relevante Rolle im hepatischen IRI zu spielen scheint. Diese hepatoprotektiven Effekte werden durch die signifikante Reduktion der JNK-, PARP- und Caspase-3-Aktivität, sowie durch eine tendenzielle Abnahme der ERK1/2-Aktivität bewirkt, welche somit relevante Zelltodmediatoren in der Gpx4-abhängigen Signalkaskade zu sein scheinen. Auch eine Tacrolimustherapie hat ähnliche Auswirkungen auf die Zelltodentwicklung und den Glutathionmetabolismus zur Folge, während sie dieselben Zelltodmediatoren in vergleichbarer Weise affiziert. Somit ist zu mutmaßen, dass auch Tacrolimus seine postischäm hepatoprotektiven Eigenschaften durch die Interaktion mit dem Gpx4-Signalweg erhält. Ebenso scheint die als Antioxidans bekannte Trägerlösung DMSO in weitaus diskreterem Ausmaß als die anderen beschriebenen Substanzen Teile der dargestellten Signalketten des oxidativen Glutathionstoffwechsels positiv zu beeinflussen. Eine Kombinationstherapie aus Tacrolimus und Baicalein konnte jedoch keine Steigerung der jeweiligen Therapieeffekte erbringen. Dies ist am ehesten auf die nachgewiesenen, relevanten toxischen Effekte der Einzelsubstanzen auf Zelltod, Leberwerte im Serum und Kreislaufparameter zurückzuführen, welche im postischämischen Umfeld jedoch durch die protektiven Effekte amortisiert zu sein schienen. Baicalein und Tacrolimus stellen somit potentielle Therapieansätze zur Reduktion des hepatischen IRI dar, sofern ein sinnvolles Maß an Protektivität im Vergleich zur Toxizität erlangt werden kann.

7. Abkürzungsverzeichnis

§

§ Paragraph

1

1°/2°Ab ... Primärer/Sekundärer Antikörper

3

3D Dreidimensional

A

α Alpha

A(CC) Arteria (carotis communis)

Abb. Abbildung

Abs. Absatz

AIF Apoptose-induzierender Faktor

ALAT Alanin-Aminotransferase

AMG Arzneimittelgesetz

ANOVA Varianzanalyse

ASAT Aspartat-Aminotransferase

ATP Adenosintri-phosphat

ATPase Adenosintri-phosphatase

B

β Beta

Baicalein/BAIC 5,6,7-Trihydroxy-2-
Phenyl-4H-1-Benzopyran-4-on

BCA Bicinchoninsäure

BSA Bovines Serumalbumin

C

c Stoffmengenkonzentration

°C Grad Celsius

(V/I)CAM (Vaskuläre / Interzelluläre)
Zelladhäsionsmoleküle

C57BL/6 C57 black 6-Maus

Ca Calcium

ca circa

CaN Calcineurin-Calmodulin-Komplex

CD(4/8) Cluster of differentiation /
Unterscheidungsgruppen (4/8)

CH Schweiz

ChE Cholinesterase

CsA Cyclosporin A

Cu Kupfer

CXC CXC-Chemokine

D

d Schichtdicke

D Deutschland

DAMP Damage-associated molecular
pattern / Schäden-assozierte
molekulare Muster

DAPI 4',6-Diamidin-2-Phenylindol

DCA 2,4-Dichloranilin

DGAV Deutsche Gesellschaft für
Allgemein- und Viszeralchirurgie

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA/DNS Desoxyribonukleinsäure

DNAse Desoxyribonuklease

DSO Deutsche Stiftung
Organtransplantation

DTNB 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure

DTT DL-Dithiothreitol-Lösung

dUTP 2'-Desoxyuridin, 5'-Triphosphat

E

e Elektron

E Extinktion

ϵ Molarer Extinktionskoeffizient

(I.)E./(I.)U. (Internationale) Einheiten

E-Selektin Endothel-Selektin

EC Endothelzellen

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA Enzyme-linked Immunosorbent
Assay

(t-/p-)ERK1/2 ... (Gesamte/Phosphorylierte)
p44/42-Mitogenaktivierte-Proteinkinase

et al. und andere

F

Fe Eisen

FIN Finnland

FK506 Tacrolimus

FKBP FK506-bindendes-Protein

Formalin Formaldehyd 4%

G

(k/m/ μ)g (Kilo- / Milli- / Mikro-)Gramm

G Gauge

γ Gamma

G(M)-CSF Granulozyten(makrophagen)-
Kolonien-Stimulationsfaktor

GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-
Dehydrogenase

GB Gallenblase

Gl. Glandula

GLDH Glutamatdehydrogenase

GOT Aspartat-Aminotransferase

GPT Alanin-Aminotransferase

Gpx Glutathionperoxidase

GR Glutathionreduktase

GSH Reduziertes Glutathion

GSH + GSSG Glutathion-Gesamt-Gehalt

GSSG oxidiertes Glutathiondisulfid

H

H⁺ Wasserstoff

H₂O Wasser

H₂O₂ Wasserstoffperoxid

HCl Hydrogenchlorid

(di-)H(p)ETE (Di-)Hydro(pero)xy-
eicosatetraensäure

HRP Meerrettichperoxidase

I

I Lichtintensität

i.p. intraperitoneal

ID Identifikationsnummer

IFN Interferon

Ig Immunglobulin

IL Interleukin

IRI Ischämie-Reperfusionsschaden

J

(t-/p-)JNK (Gesamte/Phosphorylierte)
c-Jun N-terminale Kinase

K

kDa Kilodalton

KOH Kalilauge

L

(m/μ)l..... (Milli- / Mikro-)Liter
LAS *Linkes anteriores Segment*
LDH *Laktatdehydrogenase*
LOCI „Laboratory for Optical and
Computational Instrumentation“
LOX *Lipoxygenase*
LPS *Linkes posteriores Segment*
LT *Leukotrien*

M

(m/n)m (Mikro- / Nano-)Meter
(m)M..... (Milli-)Molar
M. *Musculus*
MAP *Mittlerer arterieller Blutdruck*
MAP-Kinase *Mitogenaktivierte-
Proteinkinase*
MDH..... *Malatdehydrogenase*
mmHg *Millimeter Quecksilbersäule*
MOPS *N-Morpholinopropansulfonsäure*
MPT *Mitochondriale
Permeabilitätstransition*
MRT *Magnetresonanztomographie*
mTOR.. *Mammalian Target of Rapamycin /
Ziel von Rapamycin in Säugetieren*

N

n *Gruppengröße*
N. *Nervus*
N₂ *Stickstoffmolekül*
NaCl *Natriumchlorid*
NAD(P)H..... *Reduziertes Nicotin-
amidadenindinukleotid(phosphat)*

NAD⁺ *Oxidiertes Nicotinamidadenin-
dinukleotid*

NCCD *Nomenklatur des Zelltods*

NEM *N-Ethylmaleimid*

NF-AT(c/n).. *Kernfaktor aktivierter T-Zellen
(im Zytosol / im Nukleus)*

NH₄⁺ *Ammonium*

O

O₂ *Sauerstoffmolekül*

•O₂⁻ *Superoxidanion-Radikal*

(•)OH *Hydroxyl(-Radikal)*

OS *Omentales Segment*

P

p *p-Wert*

P *Phospho-Gruppe*

P-Selektin *Thrombozyten-Selektin*

PAF *Plättchenaktivierungsfaktor*

(t-/c-)PARP *(Gesamte/Gespaltene) Poly-
ADP-Ribose-Polymerase*

PBS *Phosphatgepufferte Salzlösung*

PMN *polymorphonukleäre, neutrophile
Leukozyten*

PVDF *Polyvinylidenfluorid*

R

RAS *Rechtes anteriores Segment*

RMS *Rechtes mittleres Segment*

ROS..... *Reaktive Sauerstoffspezies*

RPS *Rechtes posteriores Segment*

S

σ *Standardabweichung*

SAPK..... *Stress-aktivierte-Proteinkinase*
 SDS.....*Natriumdodecylsulfat*
 SE *Standardfehler*
 Sham.....*Scheinoperation / scheinoperiert*
 SOD *Superoxiddismutase*
 SPE *Festphasenextraktion*

T

Tab. *Tabelle*
 TAC *Tacrolimus*
 TdT *"terminal deoxy-nucleotidyl transferase"*
 TEMED *Tetramethylethylendiamin*
 TNB *2-Nitro-5-thiobenzoat*
 TNF..... *Tumornekrosefaktor*
 TOP *Tacrolimus-Organperfusion*
 TRIS(-HCl)..... *Trisaminomethan-
 (hydrochlorid)*

TUNEL..... *"terminal deoxy-nucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling"*

Tween® 20.....*Polysorbat-20*

U

UK..... *Vereinigtes Königreich*

USA.....*Vereinigte Staaten von Amerika*

UV.....*Ultraviolettes Licht*

V

vgl.....*vergleiche*

Vol. *Volume / Ausgabe*

X

x g..... *mal Gravitationskraft*

Z

z.B.....*zum Beispiel*

8. Quellenverzeichnis

1. Farkas S, Hackl C, Schlitt HJ. Overview of the indications and contraindications for liver transplantation. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2014;4(5).
2. Manns MP. Liver cirrhosis, transplantation and organ shortage. Deutsches Arzteblatt international. 2013;110(6):83-4.
3. DSO. Zahlen zur Organspende und -transplantation. 2018. Abrufbar unter: <https://www.dso.de/servicecenter/krankenhaeuser/zahlen-zur-organspende-und-transplantation.html>
4. Gesundheitsberichterstattung Bund. Operationen und Prozeduren in Krankenhäusern. 2018. Abrufbar unter: http://www.gbe-bund.de/gbe10/trecherche.prc_them_rech?tk=14501&tk2=18651&p_uid=gast&p_aid=60790509&p_sprache=D&cnt_ut=1&ut=18651
5. Seehofer D, Schöning W, Neuhaus P. Lebertransplantation mit postmortalen Organen. Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin. 2013;84(5):391-7.
6. Tacke F, Kroy DC, Barreiros AP, Neumann UP. Liver transplantation in Germany. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society. 2016;22(8):1136-42.
7. Deutsche Transplantationsgesellschaft. Jahresbericht 2016/2017 der Deutschen Transplantationsgesellschaft e.V. 2017. Abrufbar unter: http://www.d-t-g-online.de/images/Jahresberichte/Jahresbericht_2017.pdf
8. BZgA. Bundesweite Repräsentativbefragung 2018 – Erste Studienergebnisse. 2018. Abrufbar unter: <https://www.bzga.de/pdf.php?id=270fe3d98ffbe92636379445ca74a95e>
9. Eurotransplant. Annual Report 2016. 2017. Abrufbar unter: <http://eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=Eurotransplant+JV+PDF.pdf>
10. Lim KB, Schiano TD. Long-term outcome after liver transplantation. The Mount Sinai journal of medicine, New York. 2012;79(2):169-89.
11. Torbenson M, Wang J, Nichols L, Jain A, Fung J, Nalesnik MA. Causes of death in autopsied liver transplantation patients. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 1998;11(1):37-46.
12. Boin IF, Leonardi MI, Luzo AC, Cardoso AR, Caruy CA, Leonardi LS. Intraoperative massive transfusion decreases survival after liver transplantation. Transplantation proceedings. 2008;40(3):789-91.
13. Zarrinpar A, Busuttil RW. Liver transplantation: past, present and future. Nature reviews Gastroenterology & hepatology. 2013;10(7):434-40.
14. Charlton MR. Improving long-term outcomes after liver transplantation. Clinics in liver disease. 2014;18(3):717-30.

15. Watt KD, Pedersen RA, Kremers WK, Heimbach JK, Sanchez W, Gores GJ. Long-term probability of and mortality from de novo malignancy after liver transplantation. *Gastroenterology*. 2009;137(6):2010-7.
16. Bruns H, Lozanovski VJ, Schultze D, Hillebrand N, Hinz U, Buchler MW, et al. Prediction of postoperative mortality in liver transplantation in the era of MELD-based liver allocation: a multivariate analysis. *PloS one*. 2014;9(6):e98782.
17. Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013;10(2):79-89.
18. Zhai Y, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2011;11(8):1563-9.
19. Porte RJ, Ploeg RJ, Hansen B, van Bockel JH, Thorogood J, Persijn GG, et al. Long-term graft survival after liver transplantation in the UW era: late effects of cold ischemia and primary dysfunction. European Multicentre Study Group. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 1998;11 Suppl 1:S164-7.
20. de Rougemont O, Lehmann K, Clavien PA. Preconditioning, organ preservation, and postconditioning to prevent ischemia-reperfusion injury to the liver. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2009;15(10):1172-82.
21. Vela C, Thomsen M, Delbosc S, Calise D, Cristol JP, Mourad G. Lipid and oxidative stress disorders in a rat model of chronic rejection. *Transplantation proceedings*. 2007;39(8):2617-9.
22. Schlitt HJ, Loss M, Scherer MN, Becker T, Jauch KW, Nashan B, et al. Aktuelle Entwicklungen der Lebertransplantation in Deutschland: MELD-basierte Organallokation und „incentives“ für Transplantationszentren. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2011;49(1):30-8.
23. Dutkowski P, Oberkofler CE, Bechir M, Mullhaupt B, Geier A, Raptis DA, et al. The model for end-stage liver disease allocation system for liver transplantation saves lives, but increases morbidity and cost: a prospective outcome analysis. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2011;17(6):674-84.
24. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. *Experimental and molecular pathology*. 2003;74(2):86-93.
25. Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2005;11(3):RA76-85.

26. Fulop A, Turoczi Z, Garbaisz D, Harsanyi L, Szijarto A. Experimental models of hemorrhagic shock: a review. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes*. 2013;50(2):57-70.
27. Perez Valdivia MA, Gentil MA, Toro M, Cabello M, Rodriguez-Benot A, Mazuecos A, et al. Impact of cold ischemia time on initial graft function and survival rates in renal transplants from deceased donors performed in Andalusia. *Transplantation proceedings*. 2011;43(6):2174-6.
28. Qi QA, Yang ZY, Ma KS, Lu Q, Wang SG, Li XW, et al. Impact of cold ischemia on cytokines after partial liver transplantation in rats. *Genetics and molecular research : GMR*. 2013;12(3):4003-8.
29. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox biology*. 2015;6:524-51.
30. Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*. 2003;125(4):1246-57.
31. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2003;284(1):G15-26.
32. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Pina E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *The Journal of surgical research*. 2008;147(1):153-9.
33. Nastos C, Kalimeris K, Papoutsidakis N, Tasoulis MK, Lykoudis PM, Theodoraki K, et al. Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;2014:906965.
34. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*. 2001;94(6):1133-8.
35. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*. 2012;5(1):9-19.
36. Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free radical biology & medicine*. 2013;60:1-4.
37. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(7):1126-67.
38. Li L, Ishdorj G, Gibson SB. Reactive oxygen species regulation of autophagy in cancer: implications for cancer treatment. *Free radical biology & medicine*. 2012;53(7):1399-410.
39. Kiley PJ, Storz G. Exploiting thiol modifications. *PLoS biology*. 2004;2(11):e400.
40. Miller AF. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS letters*. 2012;586(5):585-95.
41. R&D Systems. Reactive Oxygen Species (ROS). R&D Systems' 1997 Catalog 1997. Abrufbar unter: <https://www.rndsystems.com/resources/articles/reactive-oxygen-species-ros>

42. Bautista AP, Spitzer JJ. Platelet activating factor stimulates and primes the liver, Kupffer cells and neutrophils to release superoxide anion. *Free radical research communications*. 1992;17(3):195-209.
43. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *The American journal of physiology*. 1991;260(3 Pt 1):G355-62.
44. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free radical research communications*. 1991;15(5):277-84.
45. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. *Journal of leukocyte biology*. 1992;52(4):377-82.
46. Pannen BH, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology*. 1998;27(3):755-64.
47. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *The American journal of pathology*. 1994;145(6):1421-31.
48. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacological reviews*. 2006;58(1):87-114.
49. Li JM, Shah AM. Differential NADPH- versus NADH-dependent superoxide production by phagocyte-type endothelial cell NADPH oxidase. *Cardiovascular research*. 2001;52(3):477-86.
50. Ozaki M, Deshpande SS, Angkeow P, Bellan J, Lowenstein CJ, Dinanuer MC, et al. Inhibition of the Rac1 GTPase protects against nonlethal ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis in vivo. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000;14(2):418-29.
51. Jaeschke H, Mitchell JR. Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species in isolated perfused rat liver after hypoxic injury. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;160(1):140-7.
52. Grattagliano I, Vendemiale G, Lauterburg BH. Reperfusion injury of the liver: role of mitochondria and protection by glutathione ester. *The Journal of surgical research*. 1999;86(1):2-8.
53. Girotti AW. Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of free radicals in biology & medicine*. 1985;1(2):87-95.
54. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *The Surgical clinics of North America*. 1992;72(1):65-83.
55. Rossi A, Pergola C, Cuzzocrea S, Sautebin L. The role of 5-lipoxygenase and leukotrienes in shock and ischemia-reperfusion injury. *TheScientificWorldJournal*. 2007;7:56-74.

56. Hughes H, Farhood A, Jaeschke H. Role of leukotriene B4 in the pathogenesis of hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 1992;45(2):113-9.
57. Matsui N, Fukuishi N, Fukuyama Y, Yasui Y, Akagi M. Protective effect of the 5-lipoxygenase inhibitor ardisiaquinone A on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Planta medica*. 2005;71(8):717-20.
58. Daglar G, Karaca T, Yuksek YN, Gozalan U, Akbiyik F, Sokmensuer C, et al. Effect of montelukast and MK-886 on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *The Journal of surgical research*. 2009;153(1):31-8.
59. Pallast S, Arai K, Wang X, Lo EH, van Leyen K. 12/15-Lipoxygenase targets neuronal mitochondria under oxidative stress. *Journal of neurochemistry*. 2009;111(3):882-9.
60. Conrad DJ. The arachidonate 12/15 lipoxygenases. A review of tissue expression and biologic function. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 1999;17(1-2):71-89.
61. Rymsa B, Wang JF, de Groot H. O₂⁻ release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. *The American journal of physiology*. 1991;261(4 Pt 1):G602-7.
62. Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B, Lemasters JJ. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *The Biochemical journal*. 1995;307 (Pt 1):99-106.
63. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Herman B. The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. *Molecular and cellular biochemistry*. 1997;174(1-2):159-65.
64. Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA, Jr. Role of tumor necrosis factor- α in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *The Journal of clinical investigation*. 1990;85(6):1936-43.
65. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH. Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *The Journal of surgical research*. 1994;57(2):253-8.
66. Bajt ML, Farhood A, Jaeschke H. Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2001;281(5):G1188-95.
67. Witthaut R, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H. Complement and tumor necrosis factor- α contribute to Mac-1 (CD11b/CD18) up-regulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia in vivo. *Journal of leukocyte biology*. 1994;55(1):105-11.
68. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *Journal of leukocyte biology*. 1994;55(5):662-75.
69. Farhood A, McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW, Jaeschke H. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Journal of leukocyte biology*. 1995;57(3):368-74.

70. Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *The American journal of physiology*. 1994;267(5 Pt 1):G786-93.
71. Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *The American journal of physiology*. 1996;270(5 Pt 1):G798-803.
72. Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery*. 1995;117(2):195-200.
73. Jaeschke H. Cellular adhesion molecules: regulation and functional significance in the pathogenesis of liver diseases. *The American journal of physiology*. 1997;273(3 Pt 1):G602-11.
74. Straatsburg IH, Boermeester MA, Wolbink GJ, van Gulik TM, Gouma DJ, Frederiks WM, et al. Complement activation induced by ischemia-reperfusion in humans: a study in patients undergoing partial hepatectomy. *Journal of hepatology*. 2000;32(5):783-91.
75. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *The American journal of physiology*. 1993;264(4 Pt 1):G801-9.
76. Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF. CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(2):279-89.
77. Le Moine O, Louis H, Demols A, Desalle F, Demoor F, Quertinmont E, et al. Cold liver ischemia-reperfusion injury critically depends on liver T cells and is improved by donor pretreatment with interleukin 10 in mice. *Hepatology*. 2000;31(6):1266-74.
78. Lentsch AB, Yoshidome H, Cheadle WG, Miller FN, Edwards MJ. Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: roles for macrophage inflammatory protein-2 and KC. *Hepatology*. 1998;27(4):1172-7.
79. Hisama N, Yamaguchi Y, Ishiko T, Miyanari N, Ichiguchi O, Goto M, et al. Kupffer cell production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia/reperfusion injury in rats. *Hepatology*. 1996;24(5):1193-8.
80. Walcher F, Marzi I, Fischer R, Bauer M, Larsen R. Platelet-activating factor is involved in the regulation of pathological leukocyte adhesion after liver transplantation. *The Journal of surgical research*. 1996;61(1):244-9.
81. Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology*. 1992;16(5):1236-40.
82. Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology*. 1998;27(6):1652-60.
83. Sasaki H, Matsuno T, Tanaka N, Orita K. Activation of apoptosis during the reperfusion phase after rat liver ischemia. *Transplantation proceedings*. 1996;28(3):1908-9.

84. Nishimura Y, Lemasters JJ. Glycine blocks opening of a death channel in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells during chemical hypoxia. *Cell death and differentiation*. 2001;8(8):850-8.
85. Lemasters JJ, DiGuseppi J, Nieminen AL, Herman B. Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature*. 1987;325(6099):78-81.
86. Nieminen AL, Gores GJ, Wray BE, Tanaka Y, Herman B, Lemasters JJ. Calcium dependence of bleb formation and cell death in hepatocytes. *Cell calcium*. 1988;9(5-6):237-46.
87. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*. 1995;146(1):3-15.
88. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26(4):239-57.
89. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical journal*. 1997;326 (Pt 1):1-16.
90. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*. 2012;19(1):107-20.
91. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*. 2008;27(48):6245-51.
92. Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *The FEBS journal*. 2010;277(1):2-21.
93. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal*. 1998;17(6):1675-87.
94. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development*. 2001;15(22):2922-33.
95. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996;86(1):147-57.
96. Cande C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*. 2002;84(2-3):215-22.
97. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, et al. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*. 1995;81(5):801-9.
98. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*. 1994;371(6495):346-7.
99. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 1995;376(6535):37-43.

100. Jaeschke H. Inflammation in response to hepatocellular apoptosis. *Hepatology*. 2002;35(4):964-6.
101. Rogers HW, Callery MP, Deck B, Unanue ER. *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *J Immunol*. 1996;156(2):679-84.
102. Faouzi S, Burckhardt BE, Hanson JC, Campe CB, Schrum LW, Rippe RA, et al. Anti-Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF-kappa B-independent, caspase-3-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(52):49077-82.
103. Knight TR, Jaeschke H. Acetaminophen-induced inhibition of Fas receptor-mediated liver cell apoptosis: mitochondrial dysfunction versus glutathione depletion. *Toxicology and applied pharmacology*. 2002;181(2):133-41.
104. Lemasters JJ. V. Necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *The American journal of physiology*. 1999;276(1 Pt 1):G1-6.
105. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(10):700-14.
106. Gores GJ, Nieminen AL, Wray BE, Herman B, Lemasters JJ. Intracellular pH during "chemical hypoxia" in cultured rat hepatocytes. Protection by intracellular acidosis against the onset of cell death. *The Journal of clinical investigation*. 1989;83(2):386-96.
107. Qian T, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *The American journal of physiology*. 1997;273(6 Pt 1):C1783-92.
108. Kim JS, Qian T, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology*. 2003;124(2):494-503.
109. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *The Journal of experimental medicine*. 1997;185(8):1481-6.
110. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012;149(5):1060-72.
111. Conrad M, Angeli JP, Vandenabeele P, Stockwell BR. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature reviews Drug discovery*. 2016;15(5):348-66.
112. Yagoda N, von Rechenberg M, Zaganjor E, Bauer AJ, Yang WS, Fridman DJ, et al. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature*. 2007;447(7146):864-8.
113. Xie Y, Hou W, Song X, Yu Y, Huang J, Sun X, et al. Ferroptosis: process and function. *Cell death and differentiation*. 2016;23(3):369-79.

114. Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends in cell biology*. 2016;26(3):165-76.
115. Seiler A, Schneider M, Forster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, et al. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell metabolism*. 2008;8(3):237-48.
116. Rodriguez-Lara SQ, Cardona-Munoz EG, Ramirez-Lizardo EJ, Totsuka-Sutto SE, Castillo-Romero A, Garcia-Cobian TA, et al. Alternative Interventions to Prevent Oxidative Damage following Ischemia/Reperfusion. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016:7190943.
117. Yigitkanli K, Zheng Y, Pekcec A, Lo EH, van Leyen K. Increased 12/15-Lipoxygenase Leads to Widespread Brain Injury Following Global Cerebral Ischemia. *Translational stroke research*. 2016.
118. Yigitkanli K, Pekcec A, Karatas H, Pallast S, Mandeville E, Joshi N, et al. Inhibition of 12/15-lipoxygenase as therapeutic strategy to treat stroke. *Annals of neurology*. 2013;73(1):129-35.
119. Song L, Yang H, Wang HX, Tian C, Liu Y, Zeng XJ, et al. Inhibition of 12/15 lipoxygenase by baicalein reduces myocardial ischemia/reperfusion injury via modulation of multiple signaling pathways. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2014;19(4):567-80.
120. Marks F. Der Stoffwechsel der Arachidonsäure. *Biologie in unserer Zeit*. 2000;30(6):342-53.
121. Spektrum. Arachidonsäure. 2001. Abrufbar unter: <https://www.spektrum.de/lexikon/ernaehrung/arachidonsaeure/652>
122. Marks F, Muller-Decker K, Furstenberger G. A causal relationship between unscheduled eicosanoid signaling and tumor development: cancer chemoprevention by inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Toxicology*. 2000;153(1-3):11-26.
123. Marks F, Fürstenberger G. Eicosanoids and cancer. In: Marks F, Fürstenberger G, editors. *Prostaglandins, Leukotrienes and other Eicosanoids*. Weinheim: Wiley - VCH; 1999. p. 303-30.
124. Greene ER, Huang S, Serhan CN, Panigrahy D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2011;96(1-4):27-36.
125. Dennis EA, Norris PC. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(8):511-23.
126. Honda T, Kabashima K. Prostanoids in allergy. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2015;64(1):11-6.
127. Sinzinger H, Wasinger T. Eicosanoids in the local regulation of haemostasis. *Zeitschrift für Kardiologie*. 1989;78 Suppl 6:30-4.
128. Gelman L, Fruchart JC, Auwerx J. An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 1999;55(6-7):932-43.
129. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in cancer research*. 1998;74:49-139.

130. Bornscheuer UT. Enzymes in Lipid Modification. Annual review of food science and technology. 2018;9:85-103.
131. Lundqvist A, Sandstedt M, Sandstedt J, Wickelgren R, Hansson GI, Jeppsson A, et al. The Arachidonate 15-Lipoxygenase Enzyme Product 15-HETE Is Present in Heart Tissue from Patients with Ischemic Heart Disease and Enhances Clot Formation. PLoS one. 2016;11(8):e0161629.
132. Shen T, Shi J, Wang N, Yu X, Zhang C, Li J, et al. 15-Lipoxygenase and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid regulate intravascular thrombosis in pulmonary hypertension. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology. 2015;309(5):L449-62.
133. Montero A, Badr KF. 15-Lipoxygenase in glomerular inflammation. Experimental nephrology. 2000;8(1):14-9.
134. Brash AR. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. The Journal of biological chemistry. 1999;274(34):23679-82.
135. Furstenberger G, Marks F, Krieg P. Arachidonate 8(S)-lipoxygenase. Prostaglandins & other lipid mediators. 2002;68-69:235-43.
136. Schneider C, Strayhorn WD, Brantley DM, Nanney LB, Yull FE, Brash AR. Upregulation of 8-lipoxygenase in the dermatitis of IkappaB-alpha-deficient mice. The Journal of investigative dermatology. 2004;122(3):691-8.
137. Denzlinger C. Biology and pathophysiology of leukotrienes. Critical reviews in oncology/hematology. 1996;23(3):167-223.
138. Funk CD. The molecular biology of mammalian lipoxygenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenase-deficient mice. Biochimica et biophysica acta. 1996;1304(1):65-84.
139. Rodriguez-Lagunas MJ, Storniolo CE, Ferrer R, Moreno JJ. 5-Hydroxyeicosatetraenoic acid and leukotriene D4 increase intestinal epithelial paracellular permeability. The international journal of biochemistry & cell biology. 2013;45(7):1318-26.
140. Kuhn H, O'Donnell VB. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. Progress in lipid research. 2006;45(4):334-56.
141. Loscalzo J. Membrane redox state and apoptosis: death by peroxide. Cell metabolism. 2008;8(3):182-3.
142. Kuhn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. Free radical biology & medicine. 2002;33(2):154-72.
143. Gu J, Liu Y, Wen Y, Natarajan R, Lanting L, Nadler JL. Evidence that increased 12-lipoxygenase activity induces apoptosis in fibroblasts. Journal of cellular physiology. 2001;186(3):357-65.
144. Qiao N, Lam J, Reynaud D, Abdelhaleem M, Pace-Asciak CR. The heptoxilin analog PBT-3 induces apoptosis in BCR-ABL-positive K562 leukemia cells. Anticancer research. 2003;23(5A):3617-22.
145. van Leyen K, Kim HY, Lee SR, Jin G, Arai K, Lo EH. Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. Stroke. 2006;37(12):3014-8.

146. Spektrum. Glutathion. Kompaktlexikon der Biologie 2001. Abrufbar unter: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/glutathion/4938>
147. Owen JB, Butterfield DA. Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. *Methods Mol Biol.* 2010;648:269-77.
148. Aslund F, Berndt KD, Holmgren A. Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *The Journal of biological chemistry.* 1997;272(49):30780-6.
149. Mari M, Morales A, Colell A, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants & redox signaling.* 2009;11(11):2685-700.
150. Squellerio I, Caruso D, Porro B, Veglia F, Tremoli E, Cavalca V. Direct glutathione quantification in human blood by LC-MS/MS: comparison with HPLC with electrochemical detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* 2012;71:111-8.
151. Conrad M, Schneider M, Seiler A, Bornkamm GW. Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals. *Biological chemistry.* 2007;388(10):1019-25.
152. Carlson BA, Tobe R, Yefremova E, Tsuji PA, Hoffmann VJ, Schweizer U, et al. Glutathione peroxidase 4 and vitamin E cooperatively prevent hepatocellular degeneration. *Redox biology.* 2016;9:22-31.
153. Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiological reviews.* 2014;94(3):739-77.
154. Conrad M. Transgenic mouse models for the vital selenoenzymes cytosolic thioredoxin reductase, mitochondrial thioredoxin reductase and glutathione peroxidase 4. *Biochimica et biophysica acta.* 2009;1790(11):1575-85.
155. Wirth EK, Conrad M, Winterer J, Wozny C, Carlson BA, Roth S, et al. Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2010;24(3):844-52.
156. Sengupta A, Lichti UF, Carlson BA, Cataisson C, Ryscavage AO, Mikulec C, et al. Targeted disruption of glutathione peroxidase 4 in mouse skin epithelial cells impairs postnatal hair follicle morphogenesis that is partially rescued through inhibition of COX-2. *The Journal of investigative dermatology.* 2013;133(7):1731-41.
157. Carlson BA, Yoo MH, Tobe R, Mueller C, Naranjo-Suarez S, Hoffmann VJ, et al. Thioredoxin reductase 1 protects against chemically induced hepatocarcinogenesis via control of cellular redox homeostasis. *Carcinogenesis.* 2012;33(9):1806-13.
158. Thomas JP, Maiorino M, Ursini F, Girotti AW. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *The Journal of biological chemistry.* 1990;265(1):454-61.

159. Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nature cell biology*. 2014;16(12):1180-91.
160. Liang H, Van Remmen H, Frohlich V, Lechleiter J, Richardson A, Ran Q. Gpx4 protects mitochondrial ATP generation against oxidative damage. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;356(4):893-8.
161. Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, et al. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Annals of surgery*. 2004;239(2):220-31.
162. Bilzer M, Baron A, Schauer R, Steib C, Ebensberger S, Gerbes AL. Glutathione treatment protects the rat liver against injury after warm ischemia and Kupffer cell activation. *Digestion*. 2002;66(1):49-57.
163. Shang Y, Siow YL, Isaak CK, O K. Downregulation of Glutathione Biosynthesis Contributes to Oxidative Stress and Liver Dysfunction in Acute Kidney Injury. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016:9707292.
164. Han J, Sun L, Xu Y, Liang H, Cheng Y. Activation of PPARgamma by 12/15-lipoxygenase during cerebral ischemia-reperfusion injury. *International journal of molecular medicine*. 2015;35(1):195-201.
165. Karatas H, Eun Jung J, Lo EH, van Leyen K. Inhibiting 12/15-lipoxygenase to treat acute stroke in permanent and tPA induced thrombolysis models. *Brain research*. 2018;1678:123-8.
166. Sun L, Yang L, Xu YW, Liang H, Han J, Zhao RJ, et al. Neuroprotection of hydroxysafflor yellow A in the transient focal ischemia: inhibition of protein oxidation/nitration, 12/15-lipoxygenase and blood-brain barrier disruption. *Brain research*. 2012;1473:227-35.
167. Jin G, Arai K, Murata Y, Wang S, Stins MF, Lo EH, et al. Protecting against cerebrovascular injury: contributions of 12/15-lipoxygenase to edema formation after transient focal ischemia. *Stroke*. 2008;39(9):2538-43.
168. Dabkowski ER, Williamson CL, Hollander JM. Mitochondria-specific transgenic overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx4) attenuates ischemia/reperfusion-associated cardiac dysfunction. *Free radical biology & medicine*. 2008;45(6):855-65.
169. Deschamps JD, Kenyon VA, Holman TR. Baicalein is a potent in vitro inhibitor against both reticulocyte 15-human and platelet 12-human lipoxygenases. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2006;14(12):4295-301.
170. Shao ZH, Vanden Hoek TL, Qin Y, Becker LB, Schumacker PT, Li CQ, et al. Baicalein attenuates oxidant stress in cardiomyocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002;282(3):H999-H1006.
171. Tanno Y, Kakuta Y, Aikawa T, Shindoh Y, Ohno I, Takishima T. Effects of qing-fei-tang (seihai-to) and baicalein, its main component flavonoid, on lucigenin-dependent chemiluminescence and leukotriene B4 synthesis of human alveolar macrophages. *The American journal of Chinese medicine*. 1988;16(3-4):145-54.

172. Cheng PY, Lee YM, Wu YS, Chang TW, Jin JS, Yen MH. Protective effect of baicalein against endotoxic shock in rats in vivo and in vitro. *Biochemical pharmacology*. 2007;73(6):793-804.
173. Inoue T, Jackson EK. Strong antiproliferative effects of baicalein in cultured rat hepatic stellate cells. *European journal of pharmacology*. 1999;378(1):129-35.
174. Bochorakova H, Paulova H, Slanina J, Musil P, Taborska E. Main flavonoids in the root of *Scutellaria baicalensis* cultivated in Europe and their comparative antiradical properties. *Phytotherapy research : PTR*. 2003;17(6):640-4.
175. Shen YC, Chiou WF, Chou YC, Chen CF. Mechanisms in mediating the anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human leukocytes. *European journal of pharmacology*. 2003;465(1-2):171-81.
176. Zhang DY, Wu J, Ye F, Xue L, Jiang S, Yi J, et al. Inhibition of cancer cell proliferation and prostaglandin E2 synthesis by *Scutellaria baicalensis*. *Cancer research*. 2003;63(14):4037-43.
177. Woo AY, Cheng CH, Waye MM. Baicalein protects rat cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation damage via a prooxidant mechanism. *Cardiovascular research*. 2005;65(1):244-53.
178. Chen CH, Huang LL, Huang CC, Lin CC, Lee Y, Lu FJ. Baicalein, a novel apoptotic agent for hepatoma cell lines: a potential medicine for hepatoma. *Nutrition and cancer*. 2000;38(2):287-95.
179. Xie Y, Song X, Sun X, Huang J, Zhong M, Lotze MT, et al. Identification of baicalein as a ferroptosis inhibitor by natural product library screening. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;473(4):775-80.
180. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*. 2014;156(1-2):317-31.
181. Merck KGaA. Produktbegleitendes Datenblatt zu Baicalein - CAS 491-67-8 - Calbiochem. 2008. Abrufbar unter: http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Baicalein-CAS-491-67-8-Calbiochem,EMD_BIO-196322#anchor_PDS
182. Floral Encounters. Baical Skullcap - *Scutellaria Baicalensis*. 2016. Abrufbar unter: http://www.floralencounters.com/Seeds/seed_detail.jsp?grow=Skullcap+-+Baical&productid=1120
183. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *The Journal of antibiotics*. 1987;40(9):1249-55.
184. Goto T, Kino T, Hatanaka H, Nishiyama M, Okuhara M, Kohsaka M, et al. Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplantation proceedings*. 1987;19(5 Suppl 6):4-8.
185. Stepkowski SM. Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert reviews in molecular medicine*. 2000;2(4):1-23.

186. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *The Journal of antibiotics*. 1987;40(9):1256-65.
187. Fung JJ, Starzl TE. FK506 in solid organ transplantation. *Therapeutic drug monitoring*. 1995;17(6):592-5.
188. Schmidt H. Tacrolimus In: Schmidt H, editor. *Pharmakologie und Toxikologie: für Studium und Praxis*. 6 ed. Stuttgart: Schattauer Verlag; 2007. p. 368.
189. Dabritz J, Gerner P, Enninger A, Classen M, Radke M. Inflammatory Bowel Disease in Childhood and Adolescence. *Deutsches Arzteblatt international*. 2017;114(19):331-8.
190. Pratschke S, Eder M, Heise M, Nadalin S, Pascher A, Schemmer P, et al. Protocol TOP-Study (tacrolimus organ perfusion): a prospective randomized multicenter trial to reduce ischemia reperfusion injury in transplantation of marginal liver grafts with an ex vivo tacrolimus perfusion. *Transplantation research*. 2013;2(1):3.
191. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. 1991;66(4):807-15.
192. Banerji SS, Parsons JN, Tocci MJ. The immunosuppressant FK-506 specifically inhibits mitogen-induced activation of the interleukin-2 promoter and the isolated enhancer elements NFIL-2A and NF-AT1. *Molecular and cellular biology*. 1991;11(8):4074-87.
193. Yoshimura N, Matsui S, Hamashima T, Oka T. Effect of a new immunosuppressive agent, FK506, on human lymphocyte responses in vitro. II. Inhibition of the production of IL-2 and gamma-IFN, but not B cell-stimulating factor 2. *Transplantation*. 1989;47(2):356-9.
194. Yoshimura N, Matsui S, Hamashima T, Oka T. Effect of a new immunosuppressive agent, FK506, on human lymphocyte responses in vitro. I. Inhibition of expression of alloantigen-activated suppressor cells, as well as induction of alloreactivity. *Transplantation*. 1989;47(2):351-6.
195. Yoshimura N, Matsui S, Hamashima T, Lee CJ, Oka T. A new immunosuppressive agent, FK506, inhibits the expression of alloantigen-activated suppressor cells as well as the induction of alloreactivity. *Transplantation proceedings*. 1989;21(1 Pt 1):1045-7.
196. Fung JJ, Todo S, Tzakis A, Alessiani M, Abu-Elmagd K, Jain A, et al. Current status of FK 506 in liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 1991;23(3):1902-5.
197. Todo S, Fung JJ, Demetris AJ, Jain A, Venkataramanan R, Starzl TE. Early trials with FK 506 as primary treatment in liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 1990;22(1):13-6.
198. Bradley JA. Indirect T cell recognition in allograft rejection. *International reviews of immunology*. 1996;13(3):245-55.
199. Harper SJ, Ali JM, Wlodek E, Negus MC, Harper IG, Chhabra M, et al. CD8 T-cell recognition of acquired alloantigen promotes acute allograft rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(41):12788-93.

200. Hirahara K, Nakayama T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *International immunology*. 2016;28(4):163-71.
201. Macaulay R, Akbar AN, Henson SM. The role of the T cell in age-related inflammation. *Age (Dordr)*. 2013;35(3):563-72.
202. McKinney EF, Lee JC, Jayne DR, Lyons PA, Smith KG. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature*. 2015;523(7562):612-6.
203. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2014;85(1):36-42.
204. Chen Y, Xie X. Tacrolimus attenuates myocardium damage to the total hepatic ischemia-reperfusion via regulation of the mitochondrial function. *The Journal of surgical research*. 2012;172(1):e47-54.
205. Huser N, Doll D, Altomonte J, Werner M, Kriner M, Preissel A, et al. Graft preconditioning with low-dose tacrolimus (FK506) and nitric oxide inhibitor aminoguanidine (AGH) reduces ischemia/reperfusion injury after liver transplantation in the rat. *Archives of pharmacal research*. 2009;32(2):215-20.
206. Takeichi T, Uemoto S, Minamiguchi S, Takeyoshi I, Inomata Y, Tanaka K, et al. Effect of ONO-4057 and tacrolimus on ischemia-reperfusion injury of the liver. *World journal of gastroenterology*. 2009;15(45):5712-5.
207. Garcia-Criado FJ, Palma-Vargas JM, Valdunciel-Garcia JJ, Toledo AH, Misawa K, Gomez-Alonso A, et al. Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation*. 1997;64(4):594-8.
208. Kawano K, Bowers JL, Kim YI, Tatsuma T, Kitano S, Kobayashi M, et al. FK506 reduces oxidative hepatic injury following cold ischemic preservation and transplantation. *Transplantation proceedings*. 1996;28(3):1902-3.
209. Sakr MF, Zetti GM, Farghali H, Hassanein TH, Gavalier JS, Starzl TE, et al. Protective effect of FK 506 against hepatic ischemia in rats. *Transplantation proceedings*. 1991;23(1 Pt 1):340-1.
210. Ohmori M, Kobayashi E, Harada K, Kitoh Y, Mizuta K, Uchida H, et al. Do immunosuppressants directly affect neutrophils, resulting in protection of the liver against ischemia-reperfusion injury? *Transplantation*. 1998;66(7):940-1.
211. Mizuta K, Ohmori M, Miyashita F, Kitoh Y, Fujimura A, Mori M, et al. Effect of pretreatment with FTY720 and cyclosporin on ischaemia-reperfusion injury of the liver in rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 1999;51(12):1423-8.
212. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation*. 1993;55(6):1265-72.
213. Sakr MF, Zetti GM, Hassanein TI, Farghali H, Nalesnik MA, Gavalier JS, et al. FK 506 ameliorates the hepatic injury associated with ischemia and reperfusion in rats. *Hepatology*. 1991;13(5):947-51.

214. Mazzaferro V, Scotti-Foglieni CL, Porter KA, Trejo Bellido J, Carrieri G, Todo S, et al. Studies of the hepatotrophic qualities of FK 506 and CyA. *Transplantation proceedings*. 1990;22(1):93-5.
215. Francavilla A, Barone M, Todo S, Zeng Q, Porter KA, Starzl TE. Augmentation of rat liver regeneration by FK 506 compared with cyclosporin. *Lancet*. 1989;2(8674):1248-9.
216. Pratschke S, Bilzer M, Grutzner U, Angele M, Tufman A, Jauch KW, et al. Tacrolimus preconditioning of rat liver allografts impacts glutathione homeostasis and early reperfusion injury. *The Journal of surgical research*. 2012;176(1):309-16.
217. St Peter SD, Moss AA, Mulligan DC. Effects of tacrolimus on ischemia-reperfusion injury. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2003;9(2):105-16.
218. Denas O, Sandstrom R, Cheng Y, Beal K, Herrero J, Hardison RC, et al. Genome-wide comparative analysis reveals human-mouse regulatory landscape and evolution. *BMC genomics*. 2015;16:87.
219. Cheng Y, Ma Z, Kim BH, Wu W, Cayting P, Boyle AP, et al. Principles of regulatory information conservation between mouse and human. *Nature*. 2014;515(7527):371-5.
220. Wu J, Gu L, Wang H, Tao L, Wang X. Solubility of Baicalein in Different Solvents from (287 to 323) K. *International Journal of Thermophysics*. 2014;35(8):1465-75.
221. Nogales F, Rua RM, Ojeda ML, Murillo ML, Carreras O. Oral or intraperitoneal binge drinking and oxidative balance in adolescent rats. *Chemical research in toxicology*. 2014;27(11):1926-33.
222. Fotografie von A.M. Saizew aus dem Museum der Kasaner Schule der Chemie. Abrufbar unter: <http://www.ksu.museum.ru/chmku/images/17b.jpg>
223. Brayton CF. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *The Cornell veterinarian*. 1986;76(1):61-90.
224. Bartfeld H, Goldstein A. Cell-mediated immunity: its modulation by dimethyl sulfoxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1975;243:81-90.
225. Potts GE, Rampey JH, Benjamin F. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on antibiotic sensitivity of a group of medically important microorganisms: Preliminary report. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1967;141:261-72.
226. Wood DC, Wood J. Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1975;243:7-19.
227. Djkan TI, Gunberg DL. Percutaneous absorption of two steroids dissolved in dimethyl sulfoxide in the immature female rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1967;141:406-13.
228. Pestronk A, Drachman DB. Dimethyl sulphoxide reduces anti-receptor antibody titres in experimental myasthenia gravis. *Nature*. 1980;288(5792):733-4.
229. Antony VB, Sahn SA, Repine JE. Effect of dimethyl sulfoxide on chemotaxis of phagocytic cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1983;411:321-3.

230. Colucci M, Maione F, Bonito MC, Piscopo A, Di Giannuario A, Pieretti S. New insights of dimethyl sulphoxide effects (DMSO) on experimental in vivo models of nociception and inflammation. *Pharmacological research*. 2008;57(6):419-25.
231. Repine JE, Eaton JW, Anders MW, Hoidal JR, Fox RB. Generation of hydroxyl radical by enzymes, chemicals, and human phagocytes in vitro. Detection with the anti-inflammatory agent, dimethyl sulfoxide. *The Journal of clinical investigation*. 1979;64(6):1642-51.
232. Fox RB, Fox WK. Dimethyl sulfoxide prevents hydroxyl radical-mediated depolymerization of hyaluronic acid. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1983;411:14-8.
233. Hill PK, de la Torre JC, Thompson SM, Rosenfield-Wessels S, Beckett ML. Ultrastructural studies of rat fasciculi gracilis unmyelinated fibers after contusion and DMSO treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1983;411:200-17.
234. Rosenblum W. Dimethyl sulfoxide effects on platelet aggregation and vascular reactivity in pial microcirculation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1983;411:110-9.
235. Schlafer M. Cardiac pharmacology of dimethyl sulfoxide and its postulated relevance to organ preservation in ischemic or hypoxic states. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1983;411:170-9.
236. Akyurek N, Kafali EM, Muhtaroglu S. The effects of dimethylsulfoxide on experimental hepatic ischemia. *Swiss surgery = Schweizer Chirurgie = Chirurgie suisse = Chirurgia svizzera*. 2000;6(1):23-7.
237. Sahin M, Avsar FM, Ozel H, Topaloglu S, Yilmaz B, Pasaoglu H, et al. The effects of dimethyl sulfoxide on liver damage caused by ischemia-reperfusion. *Transplantation proceedings*. 2004;36(9):2590-2.
238. Thal SC, Plesnila N. Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO₂ during surgical anesthesia in mice. *Journal of neuroscience methods*. 2007;159(2):261-7.
239. Fleischmann T, Jirkof P, Henke J, Arras M, Cesarovic N. Injection anaesthesia with fentanyl-midazolam-medetomidine in adult female mice: importance of antagonization and perioperative care. *Laboratory animals*. 2016;50(4):264-74.
240. Hori T, Ohashi N, Chen F, Baine AM, Gardner LB, Jermanus S, et al. Simple and sure methodology for massive hepatectomy in the mouse. *Annals of gastroenterology : quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*. 2011;24(4):307-18.
241. Nikfarjam M, Malcontenti-Wilson C, Fanartzis M, Daruwalla J, Christophi C. A model of partial hepatectomy in mice. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2004;17(5):291-4.
242. Makino H, Togo S, Kubota T, Morioka D, Morita T, Kobayashi T, et al. A good model of hepatic failure after excessive hepatectomy in mice. *The Journal of surgical research*. 2005;127(2):171-6.
243. Mitchell C, Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nature protocols*. 2008;3(7):1167-70.

244. Donovan J, Brown P. Euthanasia. Current protocols in immunology. 2006;Chapter 1:Unit 1 8.
245. Sarstedt AG. Technisches Datenblatt zu Mikro-Probengefäß 1,3ml, Serum mit Gerinnungsaktivator. Abrufbar unter: <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/venenblut/paeparierte-gefaesse/produkt/41.1392.105/>
246. Oberhaus SM. TUNEL and immunofluorescence double-labeling assay for apoptotic cells with specific antigen(s). Methods Mol Biol. 2003;218:85-96.
247. Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. Methods Mol Biol. 2012;887:41-7.
248. Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. Trends in cell biology. 1995;5(1):21-6.
249. Saraste A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. Herz. 1999;24(3):189-95.
250. Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell. Immunology today. 1986;7(4):115-9.
251. Compton MM. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. Cancer metastasis reviews. 1992;11(2):105-19.
252. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. The Journal of cell biology. 1992;119(3):493-501.
253. Roche. Produktbeschreibung von "In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein". 2012. Abrufbar unter: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11684795910bul.pdf>
254. Abrufbar unter: <http://www.chemie.de/lexikon/Fluorescein.html>
255. Niedermayr A. Fluoreszenzmikroskopie. 2010. Abrufbar unter: <https://lp.uni-goettingen.de/get/text/6741>
256. Wilson WD, Tanious FA, Barton HJ, Jones RL, Fox K, Wydra RL, et al. DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Biochemistry. 1990;29(36):8452-61.
257. Vector Laboratories. Produktbeschreibung von "VECTASHIELD HardSet Antifade Mounting Medium with DAPI". Abrufbar unter: <https://vectorlabs.com/vectashield-hardset-mounting-medium-with-dapi.html>
258. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1979;76(7):3116-20.
259. Burnette WN. Western blotting. Clinical chemistry. 2011;57(1):132-3.
260. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Analytical biochemistry. 1981;112(2):195-203.
261. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. Methods. 2006;38(4):283-93.

262. Cell Signaling. Produktbeschreibung von Cell Lysis Buffer (10x). 2018. Abrufbar unter: <https://www.cellsignal.at/products/buffers-dyes/cell-lysis-buffer-10x/9803>
263. Hnasko TS, Hnasko RM. The Western Blot. *Methods Mol Biol.* 2015;1318:87-96.
264. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry.* 1985;150(1):76-85.
265. Thermo Scientific. Produktbeschreibung von Pierce™ BCA Protein Assay Kit. 2018. Abrufbar unter: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225>
266. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 1994;32:5-8.
267. Lee C. Western blotting. *Methods Mol Biol.* 2007;362:391-9.
268. Gwozdz T, Dorey K. Western Blot. In: Jalali M, Saldanha FYL, Jalali M, editors. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*: Academic Press; 2017. p. 99-117.
269. Goldman A, Ursitti JA, Mozdzanowski J, Speicher DW. Electrophoretic transfer from Polyacrylamide Gels. *Current protocols in protein science.* 2015;82:10 7 1-6.
270. Serva. Produktbeschreibung von Ponceau S. 2018. Abrufbar unter: https://www.serva.de/enDE/ProductDetails/786_33429_Ponceau_S_0_0.html
271. Cell Signaling. Produktbeschreibung von Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody. 2018. Abrufbar unter: <https://www.cellsignal.com/products/secondary-antibodies/anti-rabbit-igg-hrp-linked-antibody/7074>
272. Farrell RE. Principles of Detection. *RNA Methodologies* (4th Edition): Academic Press; 2010. p. 301-20.
273. DiaSys GmbH. Produktbeschreibung von Kits für Hitachi 917: Creatinine FS. 2016. Abrufbar unter: [https://www.diasys-deutschland.de/misc/download/?tx_vierwddiasysproducts_download\[file\]=%2Fdownloads%2Fdiasys.de%2FPackage%20inserts%20reagents%20general%2FCreatinine%2FCrea%20Jaffe%2FPI-g-CREA_JAFFE-18.pdf&tx_vierwddiasysproducts_download\[msds\]=&cHash=1e64e8d55c0d4b91f3e5beb58c71bcd4](https://www.diasys-deutschland.de/misc/download/?tx_vierwddiasysproducts_download[file]=%2Fdownloads%2Fdiasys.de%2FPackage%20inserts%20reagents%20general%2FCreatinine%2FCrea%20Jaffe%2FPI-g-CREA_JAFFE-18.pdf&tx_vierwddiasysproducts_download[msds]=&cHash=1e64e8d55c0d4b91f3e5beb58c71bcd4)
274. DiaSys GmbH. Produktbeschreibung von Kits für Hitachi 917: Bilirubin Auto Total FS. 2014. Abrufbar unter: [https://www.diasys-deutschland.de/misc/download/?tx_vierwddiasysproducts_download\[file\]=%2Fdownloads%2Fdiasys.de%2FPackage%20inserts%20reagents%20general%2FBilirubin%2FBili%20total%2FPI-g-BIL_TOTAL-16.pdf&tx_vierwddiasysproducts_download\[msds\]=&cHash=e7c19a7655a29290f8043f5b6c9bce9c](https://www.diasys-deutschland.de/misc/download/?tx_vierwddiasysproducts_download[file]=%2Fdownloads%2Fdiasys.de%2FPackage%20inserts%20reagents%20general%2FBilirubin%2FBili%20total%2FPI-g-BIL_TOTAL-16.pdf&tx_vierwddiasysproducts_download[msds]=&cHash=e7c19a7655a29290f8043f5b6c9bce9c)
275. DiaSys GmbH. Produktbeschreibung von Kits für Hitachi 917: Cholinesterase FS. 2016. Abrufbar unter: [https://www.diasys-deutschland.de/misc/download/?tx_vierwddiasysproducts_download\[file\]=%2Fdownloads%2Fdiasys.de%2FPackage%20inserts%20reagents%20general%2FCholinesterase%2FPI-g-CHE-](https://www.diasys-deutschland.de/misc/download/?tx_vierwddiasysproducts_download[file]=%2Fdownloads%2Fdiasys.de%2FPackage%20inserts%20reagents%20general%2FCholinesterase%2FPI-g-CHE-)

- 10.pdf&tx_vierwddiasysproducts_download[msds]=&cHash=7376d40bd66788882dd32375397b0dd3
276. DiaSys GmbH. Produktbeschreibung von Kits für Hitachi 917: ASAT (GOT) FS (IFCC mod.). 2017. Abrufbar unter: [https://www.diasys-deutschland.de/misc/download/?tx_vierwddiasysproducts_download\[file\]=%2Fdownloads%2Fdiasys.de%2FPackage%20inserts%20reagents%20general%2FASAT%2FPI-g-AST-14.pdf&tx_vierwddiasysproducts_download\[msds\]=&cHash=68123d0282814c3a8be92df092735685](https://www.diasys-deutschland.de/misc/download/?tx_vierwddiasysproducts_download[file]=%2Fdownloads%2Fdiasys.de%2FPackage%20inserts%20reagents%20general%2FASAT%2FPI-g-AST-14.pdf&tx_vierwddiasysproducts_download[msds]=&cHash=68123d0282814c3a8be92df092735685)
 277. Weiß G. Laboruntersuchungen nach Symptomen und Krankheiten. Berlin: Springer; 1978.
 278. DiaSys GmbH. Produktbeschreibung von Kits für Hitachi 917: ALAT (GPT) FS (IFCC mod.). 2014. Abrufbar unter: [https://www.diasys-deutschland.de/misc/download/?tx_vierwddiasysproducts_download\[file\]=%2Fdownloads%2Fdiasys.de%2FPackage%20inserts%20reagents%20general%2FALAT%2FPI-g-ALT-12.pdf&tx_vierwddiasysproducts_download\[msds\]=&cHash=8f3c66c22242f589d569931773f37a04](https://www.diasys-deutschland.de/misc/download/?tx_vierwddiasysproducts_download[file]=%2Fdownloads%2Fdiasys.de%2FPackage%20inserts%20reagents%20general%2FALAT%2FPI-g-ALT-12.pdf&tx_vierwddiasysproducts_download[msds]=&cHash=8f3c66c22242f589d569931773f37a04)
 279. DiaSys GmbH. Produktbeschreibung von Kits für Hitachi 917: GLDH FS DGKC. 2014. Abrufbar unter: [https://www.diasys-deutschland.de/misc/download/?tx_vierwddiasysproducts_download\[file\]=%2Fdownloads%2Fdiasys.de%2FPackage%20inserts%20reagents%20general%2FGLDH%2FPI-g-GLDH-8.pdf&tx_vierwddiasysproducts_download\[msds\]=&cHash=66b1dbc9369f3f579120dbdfa890a226](https://www.diasys-deutschland.de/misc/download/?tx_vierwddiasysproducts_download[file]=%2Fdownloads%2Fdiasys.de%2FPackage%20inserts%20reagents%20general%2FGLDH%2FPI-g-GLDH-8.pdf&tx_vierwddiasysproducts_download[msds]=&cHash=66b1dbc9369f3f579120dbdfa890a226)
 280. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical biochemistry*. 1969;27(3):502-22.
 281. Ellman GL. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1958;74(2):443-50.
 282. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1959;82(1):70-7.
 283. Lauterburg BH, Adams JD, Mitchell JR. Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology*. 1984;4(4):586-90.
 284. Thurman EM, Mills MS. Solid-phase extraction : principles and practice. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1998.
 285. Abdi H. The Bonferonni and Šidák Corrections for Multiple Comparisons. In: Salkind NJ, editor. *Encyclopedia of Measurement and Statistics*. Thousand Oaks: Sage; 2007. p. 103-7.
 286. Sheskin DJ. *Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures*. 5 ed: Chapman and Hall/CRC; 2011.

287. GraphPad Software. Bonferroni and Sidak methods. 2017. Abrufbar unter: https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm?stat_holms_multiple_comparison_test.htm
288. GraphPad Software. Tukey and Dunnett methods. 2017. Abrufbar unter: https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm?stat_the_methods_of_tukey_and_dunne.htm
289. Biau DJ. In brief: Standard deviation and standard error. *Clinical orthopaedics and related research*. 2011;469(9):2661-4.
290. Lane DM. Sampling Distribution of Difference Between Means Abrufbar unter: http://onlinestatbook.com/2/sampling_distributions/samplingdist_diff_means.html
291. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):671-5.
292. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *BioTechniques*. 2007;43(1 Suppl):25-30.
293. Spektrum. Photometrie. *Lexikon der Chemie* 1998. Abrufbar unter: <https://www.spektrum.de/lexikon/chemie/photometrie/7084>
294. Spektrum. Spektralphotometrie. *Lexikon der Physik* 1998. Abrufbar unter: <https://www.spektrum.de/lexikon/physik/spektralphotometrie/13545>
295. Spektrum. Extinktion. *Lexikon der Chemie* 1998. Abrufbar unter: <https://www.spektrum.de/lexikon/chemie/extinktion/3190>
296. Spektrum. Lambert-Beersches Gesetz. *Lexikon der Chemie* 1998. Abrufbar unter: <https://www.spektrum.de/lexikon/chemie/lambert-beersches-gesetz/5220>
297. Langer RM, Cohen B, Rahmel A. History of eurotransplant. *Transplantation proceedings*. 2012;44(7):2130-1.
298. Rentsch M, Beham A, Iesalnieks I, Mirwald T, Anthuber M, Jauch KW. Impact of prolonged cold ischemia and reperfusion on apoptosis, activation of caspase 3, and expression of bax after liver transplantation in the rat. *Transplantation proceedings*. 2001;33(1-2):850-1.
299. Klaus F, Castro DB, Bittar CM, Bittar AE, Keitel E, Seelig DC, et al. Kidney transplantation with Belzer or Custodiol solution: a randomized prospective study. *Transplantation proceedings*. 2007;39(2):353-4.
300. Zhu XH, Pan JP, Wu YF, Ding YT. Effects of warm ischemia time on biliary injury in rat liver transplantation. *World journal of gastroenterology*. 2012;18(43):6308-14.
301. Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K. Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology*. 1992;16(2):454-61.
302. Du Z, Dong S, Lin P, Chen S, Wu S, Zhang S, et al. Warm ischemia may damage peribiliary vascular plexus during DCD liver transplantation. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(1):758-63.
303. Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: insights from transgenic knockout models. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(11):1683-98.

304. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *The New England journal of medicine*. 2009;361(16):1570-83.
305. Pirenne J, Gunson B, Khaleef H, Hubscher S, Afford S, McMaster P, et al. Influence of ischemia-reperfusion injury on rejection after liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 1997;29(1-2):366-7.
306. Xie C, Wei W, Zhang T, Dirsch O, Dahmen U. Monitoring of systemic and hepatic hemodynamic parameters in mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2014(92):e51955.
307. Meijer MK, Spruijt BM, van Zutphen LF, Baumans V. Effect of restraint and injection methods on heart rate and body temperature in mice. *Laboratory animals*. 2006;40(4):382-91.
308. Baek JM, Kwak SC, Kim JY, Ahn SJ, Jun HY, Yoon KH, et al. Evaluation of a novel technique for intraperitoneal injections in mice. *Lab Anim (NY)*. 2015;44(11):440-4.
309. Miner NA, Koehler J, Greenaway L. Intraperitoneal injection of mice. *Applied microbiology*. 1969;17(2):250-1.
310. Shimizu S. Routes of Administration. In: Hedrich HJ, Bullock G, editors. *The Laboratory Mouse*: Elsevier - Academic Press; 2004. p. 527-42.
311. Li Z, Sun F, Zhang Y, Chen H, He N, Song P, et al. Tacrolimus Induces Insulin Resistance and Increases the Glucose Absorption in the Jejunum: A Potential Mechanism of the Diabetogenic Effects. *PloS one*. 2015;10(11):e0143405.
312. Balibrea JM, Garcia-Martin MC, Cuesta-Sancho S, Olmedilla Y, Arias-Diaz J, Fernandez-Sevilla E, et al. Tacrolimus modulates liver and pancreas nitric oxide synthetase and heme-oxygenase isoforms and cytokine production after endotoxemia. *Nitric oxide : biology and chemistry*. 2011;24(2):113-22.
313. Arab HA, Cheung K, Hickman PE, Potter JM, Walker NI, Roberts MS. A comparison of hepatic ischemia/hypoxia-reperfusion injury models. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2013;68(3):349-56.
314. Karatzas T, Neri AA, Baibaki ME, Dontas IA. Rodent models of hepatic ischemia-reperfusion injury: time and percentage-related pathophysiological mechanisms. *The Journal of surgical research*. 2014;191(2):399-412.
315. Otto GP, Rathkolb B, Oestereich MA, Lengger CJ, Moerth C, Micklich K, et al. Clinical Chemistry Reference Intervals for C57BL/6J, C57BL/6N, and C3HeB/FeJ Mice (*Mus musculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*. 2016;55(4):375-86.
316. Grutzner U, Keller M, Bach M, Kierner AK, Meissner H, Bilzer M, et al. PI 3-kinase pathway is responsible for antiapoptotic effects of atrial natriuretic peptide in rat liver transplantation. *World journal of gastroenterology*. 2006;12(7):1049-55.
317. van Zeeland YRA, Wilde A, Bosman IH, Uilenreef JJ, Egner B, Schoemaker NJ. Non-invasive blood pressure measurement in ferrets (*Mustela putorius furo*) using high definition oscillometry. *Vet J*. 2017;228:53-62.
318. Feng M, DiPetrillo K. Non-invasive blood pressure measurement in mice. *Methods Mol Biol*. 2009;573:45-55.

319. Santillan A, Rubin DG, Foley CP, Sondhi D, Crystal RG, Gobin YP, et al. Cannulation of the internal carotid artery in mice: a novel technique for intra-arterial delivery of therapeutics. *Journal of neuroscience methods*. 2014;222:106-10.
320. Shen W, Kamendulis LM, Ray SD, Corcoran GB. Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocytes: effects of Ca(2+)-endonuclease, DNA repair, and glutathione depletion inhibitors on DNA fragmentation and cell death. *Toxicology and applied pharmacology*. 1992;112(1):32-40.
321. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecy B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology*. 1995;21(5):1465-8.
322. Such-Sanmartin G, Bache N, Callesen AK, Rogowska-Wrzesinska A, Jensen ON. Targeted mass spectrometry analysis of the proteins IGF1, IGF2, IBP2, IBP3 and A2GL by blood protein precipitation. *Journal of proteomics*. 2015;113:29-37.
323. Fung EN, Bryan P, Kozhich A. Techniques for quantitative LC-MS/MS analysis of protein therapeutics: advances in enzyme digestion and immunocapture. *Bioanalysis*. 2016;8(8):847-56.
324. Southard JN. Protein analysis using real-time PCR instrumentation: incorporation in an integrated, inquiry-based project. *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2014;42(2):142-51.
325. Iwasaki Y, Saito Y, Nakano Y, Mochizuki K, Sakata O, Ito R, et al. Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2009;877(28):3309-17.
326. Tipple TE, Rogers LK. Methods for the determination of plasma or tissue glutathione levels. *Methods Mol Biol*. 2012;889:315-24.
327. Student. The Probable Error of a Mean. *Biometrika*. 1908;6(1):1-25.
328. Heisler-Taylor T, Kim B, Reese AY, Hamadmad S, Kusibati R, Fischer AJ, et al. A new multichannel method quantitating TUNEL in detached photoreceptor nuclei. *Experimental eye research*. 2018;176:121-9.
329. Maidana DE, Tsoka P, Tian B, Dib B, Matsumoto H, Kataoka K, et al. A Novel ImageJ Macro for Automated Cell Death Quantitation in the Retina. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2015;56(11):6701-8.
330. Gallo-Oller G, Ordonez R, Dotor J. A new background subtraction method for Western blot densitometry band quantification through image analysis software. *Journal of immunological methods*. 2018;457:1-5.
331. Carmichael FJ, Lindop MJ, Farman JV. Anesthesia for hepatic transplantation: cardiovascular and metabolic alterations and their management. *Anesthesia and analgesia*. 1985;64(2):108-16.
332. Dagar G, Taneja A, Nanchal RS. Abdominal Circulatory Interactions. *Critical care clinics*. 2016;32(2):265-77.

333. Kuga N, Hirata T, Sakai I, Tanikawa Y, Chiou HY, Kitanishi T, et al. Rapid and local autoregulation of cerebrovascular blood flow: a deep-brain imaging study in the mouse. *The Journal of physiology*. 2009;587(Pt 4):745-52.
334. Doll S, Proneth B, Tyurina YY, Panzilius E, Kobayashi S, Ingold I, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nature chemical biology*. 2017;13(1):91-8.
335. Nomura K, Imai H, Koumura T, Arai M, Nakagawa Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(41):29294-302.
336. Mueller TH, Kienle K, Beham A, Geissler EK, Jauch KW, Rentsch M. Caspase 3 inhibition improves survival and reduces early graft injury after ischemia and reperfusion in rat liver transplantation. *Transplantation*. 2004;78(9):1267-73.
337. Yan B, Peng Z, Xing X, Du C. Glibenclamide induces apoptosis by activating reactive oxygen species dependent JNK pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Bioscience reports*. 2017;37(5).
338. Ahmed S, Grant KG, Edwards LE, Rahman A, Cirit M, Goshe MB, et al. Data-driven modeling reconciles kinetics of ERK phosphorylation, localization, and activity states. *Molecular systems biology*. 2014;10:718.
339. Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(50):33533-9.
340. Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochemical Society symposium*. 1999;64:1-12.
341. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2004;68(2):320-44.
342. Ito Y, Lind RC, Begay CK, Gandolfi AJ, McCuskey MK, McCuskey RS. Late administration of dimethyl sulfoxide minimizes the hepatic microvascular inflammatory response to chloroform in rats. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2000;18(3):203-17.
343. Rentsch M, Puellmann K, Sirek S, Iesalnieks I, Kienle K, Mueller T, et al. Benefit of Kupffer cell modulation with glycine versus Kupffer cell depletion after liver transplantation in the rat: effects on postischemic reperfusion injury, apoptotic cell death graft regeneration and survival. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2005;18(9):1079-89.
344. Maemura K, Zheng Q, Wada T, Ozaki M, Takao S, Aikou T, et al. Reactive oxygen species are essential mediators in antigen presentation by Kupffer cells. *Immunology and cell biology*. 2005;83(4):336-43.
345. Iida C, Fujii K, Koga E, Washino Y, Ichi I, Kojo S. Inhibitory effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on necrosis and oxidative stress caused by D-galactosamine in the rat liver. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2007;53(2):160-5.

346. Allgower M, Burri C. ["Shock index"]. *Dtsch Med Wochenschr.* 1967;92(43):1947-50.
347. Bacsik CJ, Swift JQ, Hargreaves KM. Toxic systemic reactions of bupivacaine and etidocaine. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics. 1995;79(1):18-23.
348. Senkus E, Jassem J. Cardiovascular effects of systemic cancer treatment. *Cancer treatment reviews.* 2011;37(4):300-11.
349. Hughes ZE, Mark AE, Mancera RL. Molecular dynamics simulations of the interactions of DMSO with DPPC and DOPC phospholipid membranes. *The journal of physical chemistry B.* 2012;116(39):11911-23.
350. Morris C, de Wreede L, Scholten M, Brand R, van Biezen A, Sureda A, et al. Should the standard dimethyl sulfoxide concentration be reduced? Results of a European Group for Blood and Marrow Transplantation prospective noninterventional study on usage and side effects of dimethyl sulfoxide. *Transfusion.* 2014;54(10):2514-22.
351. Jacob SW, Rosenbaum EE. The toxicology of dimethyl sulfoxide (DMSO). *Headache.* 1966;6(3):127-36.
352. Huang X, He Y, Chen Y, Wu P, Gui D, Cai H, et al. Baicalin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via adenosine A2a receptor related TGF-beta1-induced ERK1/2 signaling pathway. *BMC pulmonary medicine.* 2016;16(1):132.
353. Zhang L, Pu Z, Wang J, Zhang Z, Hu D. Baicalin inhibits hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation via the AKT/HIF-1alpha/p27-associated pathway. *International journal of molecular sciences.* 2014;15(5):8153-68.
354. Pazin M, Andreo TB, Pereira LC, Bernardes MFF, Ferrari RS, Dorta DJ. Baicalein can be a great antioxidant, but it can impair mitochondrial bioenergetics and cause cytotoxicity at high concentrations. *Applied Research in Toxicology.* 2015;1(1):9-18.
355. Wang Y, Wang Q, Zhang S, Zhang Y, Tao L. Baicalein increases the cytotoxicity of cisplatin by enhancing gap junction intercellular communication. *Molecular medicine reports.* 2014;10(1):515-21.
356. Shen X, Wang Y, Gao F, Ren F, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, et al. CD4 T cells promote tissue inflammation via CD40 signaling without de novo activation in a murine model of liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.* 2009;50(5):1537-46.
357. Khandoga A, Hanschen M, Kessler JS, Krombach F. CD4+ T cells contribute to postischemic liver injury in mice by interacting with sinusoidal endothelium and platelets. *Hepatology.* 2006;43(2):306-15.
358. Hanschen M, Zahler S, Krombach F, Khandoga A. Reciprocal activation between CD4+ T cells and Kupffer cells during hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation.* 2008;86(5):710-8.
359. Soda Y, el-Assal ON, Yu L, Nagasue N. Suppressed endothelin-1 production by FK506 and cyclosporin A in ischemia/reperfusion of rat small intestine. *Surgery.* 1999;125(1):23-32.
360. Tojimbara T, Bermudez LE, Egawa H, Hayashi M, So SK, Esquivel CO. Cyclosporine and tacrolimus both suppress activation of Kupffer cells in vitro. *Transplantation proceedings.* 1996;28(3):1381-2.

361. Gomez-Lechon MJ, Serralta A, Donato MT, Jimenez N, O'Connor E, Castell JV, et al. The immunosuppressant drug FK506 prevents Fas-induced apoptosis in human hepatocytes. *Biochemical pharmacology*. 2004;68(12):2427-33.
362. Crenesse D, Laurens M, Heurteaux C, Cursio R, Saint-Paul MC, Schmid-Alliana A, et al. Rat liver ischemia-reperfusion-induced apoptosis and necrosis are decreased by FK506 pretreatment. *European journal of pharmacology*. 2003;473(2-3):177-84.
363. Pratschke S, Arnold H, Zollner A, Heise M, Pascher A, Schemmer P, et al. Results of the TOP Study: Prospectively Randomized Multicenter Trial of an Ex Vivo Tacrolimus Rinse Before Transplantation in EDC Livers. *Transplantation direct*. 2016;2(6):e76.
364. Ko MS, Choi YH, Jung SH, Lee JS, Kim HS, Lee CH, et al. Tacrolimus therapy causes hepatotoxicity in patients with a history of liver disease. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 2015;53(5):363-71.
365. Ferjani H, El Arem A, Bouraoui A, Achour A, Abid S, Bacha H, et al. Protective effect of mycophenolate mofetil against nephrotoxicity and hepatotoxicity induced by tacrolimus in Wistar rats. *Journal of physiology and biochemistry*. 2016;72(2):133-44.
366. Mesar I, Kes P, Hudolin T, Basic-Jukic N. Rescue therapy with sirolimus in a renal transplant recipient with tacrolimus-induced hepatotoxicity. *Renal failure*. 2013;35(10):1434-5.
367. Sacher VY, Bejarano PA, Pham SM. Tacrolimus induced hepatotoxicity in a patient with bilateral lung transplant. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2012;25(10):e111-2.
368. Oto T, Okazaki M, Takata K, Egi M, Yamane M, Toyooka S, et al. Calcineurin inhibitor-related cholestasis complicating lung transplantation. *The Annals of thoracic surgery*. 2010;89(5):1664-5.
369. Serrano T, Mitry RR, Terry C, Lehec SC, Dhawan A, Hughes RD. The effects of immunosuppressive agents on the function of human hepatocytes in vitro. *Cell transplantation*. 2006;15(8-9):777-83.
370. Zhang W, Wang J, Li C, Zhang Z, Dirie NI, Dong H, et al. Infrahepatic inferior vena cava clamping with Pringle maneuvers for laparoscopic extracapsular enucleation of giant liver hemangiomas. *Surgical endoscopy*. 2017;31(9):3628-36.
371. Pringle JH. V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. *Annals of surgery*. 1908;48(4):541-9.
372. Sanjay P, Ong I, Bartlett A, Powell JJ, Wigmore SJ. Meta-analysis of intermittent Pringle manoeuvre versus no Pringle manoeuvre in elective liver surgery. *ANZ journal of surgery*. 2013;83(10):719-23.
373. Maurer CA, Walensi M, Kaser SA, Kunzli BM, Lotscher R, Zuse A. Liver resections can be performed safely without Pringle maneuver: A prospective study. *World journal of hepatology*. 2016;8(24):1038-46.
374. Garcea G, Gescher A, Steward W, Dennison A, Berry D. Oxidative stress in humans following the Pringle manoeuvre. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*. 2006;5(2):210-4.

- 375. Eshkenazy R, Dreznik Y, Lahat E, Zakai BB, Zendel A, Ariche A. Small for size liver remnant following resection: prevention and management. *Hepatobiliary surgery and nutrition*. 2014;3(5):303-12.
- 376. Ikegami T, Shimada M, Imura S, Arakawa Y, Nii A, Morine Y, et al. Current concept of small-for-size grafts in living donor liver transplantation. *Surgery today*. 2008;38(11):971-82.
- 377. Boillot O, Delafosse B, Mechet I, Boucaud C, Pouyet M. Small-for-size partial liver graft in an adult recipient; a new transplant technique. *Lancet*. 2002;359(9304):406-7.
- 378. Demetris AJ, Kelly DM, Egtesad B, Fontes P, Wallis Marsh J, Tom K, et al. Pathophysiologic observations and histopathologic recognition of the portal hyperperfusion or small-for-size syndrome. *The American journal of surgical pathology*. 2006;30(8):986-93.
- 379. Asencio JM, Vaquero J, Olmedilla L, Garcia Sabrido JL. "Small-for-flow" syndrome: shifting the "size" paradigm. *Medical hypotheses*. 2013;80(5):573-7.

9. Danksagung

Zutiefst möchte ich mich zunächst bei meinem Doktorvater und wissenschaftlichen Mentor Prof. Dr. Markus Rentsch bedanken, der die Idee für dieses Forschungsprojekt entwickelt und somit dieses erst ermöglicht hat. Ich möchte ihm dafür danken, dass er mich stets mit Rat und Tat unterstützt hat und bei allen Fragen als konstruktiver Ansprechpartner zur Stelle war. Die gemeinsame Arbeit an diesem Forschungsvorhaben hat meine Begeisterung für die Chirurgie bekräftigt, weshalb ich den Beruf ergriffen habe, in dem ich heute arbeite. Durch seine empathische, humorvolle und freundliche Art hat Prof. Dr. Markus Rentsch hieran maßgeblichen Einfluss.

Darüber hinaus gilt mein größter Dank Priv.Do. Dr. Michael Thomas, der mich seit Beginn meiner wissenschaftlichen Tätigkeit an der Chirurgischen Klinik des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität unterstützt und betreut hat. Ohne seine tatkräftige Hilfe wäre die hier dargestellte Forschungsarbeit nicht möglich gewesen. Sämtliche wissenschaftlichen Techniken von der Durchführung der beschriebenen Operationen bis zu den verwendeten laboranalytischen Methoden hat er mir in zahlreichen Stunden selbstlos und dabei stets ausgesprochen nett, freundschaftlich und mit Spaß beigebracht, wobei er mir für Rückfragen zu jeder Zeit zur Verfügung stand. Es ist daher eine unermesslich große Ehre, Herrn PD Dr. Michael Thomas heute nicht nur meinen Kollegen, sondern auch einen guten Freund nennen zu dürfen.

Weiterhin gilt ein großer Dank Prof. Dr. Markus Guba, über dessen Arbeitsgruppe „Tumor & Transplantation“ und deren Infrastruktur ich einen Großteil der wissenschaftlichen Arbeit verrichten durfte und hierdurch auf wissenschaftliche Ebene außerordentliche Unterstützung erfuhr. Den wissenschaftlichen Mitarbeitern Anne Wagner, Nina Schupp, Simon Gahr und Christina Dengler bin ich für ihre tatkräftige, sympathische und vor allen Dingen lehrreiche Unterstützung bei den Laborarbeiten ebenfalls sehr dankbar.

Dem Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der LMU, Prof. Dr. Jens Werner, sowie dessem Vorgänger im Amt, Prof. Dr. Karl-Walter Jauch, möchte ich von Herzen danken, dass ich an ihrer Klinik mein Promotionsvorhaben beginnen und durchführen durfte. Ebenso möchte ich Frau Prof. Dr. Lesca Miriam Holdt aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin, sowie Herrn Priv.Do. Dr. Christian Steib aus der Medizinischen

Klinik II der LMU für ihre Kooperationsarbeit im Rahmen der wissenschaftlichen Auswertungen danken.

Nicht zuletzt gilt ein großer Dank meiner Familie. Meine Eltern Kerstin und Karl-Heinz Drefs, wie auch meine Brüder Robin, Felix und Simon, sowie meine Frau Eva haben mich während meines Promotionsvorhabens und weit darüber hinaus permanent und uneingeschränkt unterstützt, wofür ich Ihnen von tiefstem Herzen dankbar bin.

10. Eidesstattliche Versicherung



Eidesstattliche Versicherung

Drefs, Moritz

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

"Der Einfluss von 12/15-Lipoxygenase-Hemmung und Tacrolimus-Behandlung auf die Glutathionperoxidase-4-abhängige Signalkaskade im hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden"

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 19.12.2019

Ort, Datum

Moritz Drefs

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand